

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: INGENIERO E
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

TEMA:

**ANÁLISIS MULTIVARIADO DE COMPONENTES TERPÉNICOS, EN
ACEITE ESENCIAL DE HIERBA LUISA (*Cymbopogon citratus*), MEDIANTE
ESPECTROFOTOMETRÍA UV - VISIBLE DERIVADA**

AUTORES:

MANUEL ESTEBAN GÓMEZ ARAUJO

VIVIANA ALEXANDRA TITO GONZAGA

TUTOR:

CHRISTIAN FABRICIO LARENAS URÍA

Quito, octubre del 2017

Cesión de derechos de autor

Nosotros Manuel Esteban Gómez Araujo y Viviana Alexandra Tito Gonzaga, con documentos de identificación N° 1717079329 y 1722758404 respectivamente, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo de titulación intitulado: “ANÁLISIS MULTIVARIADO DE COMPONENTES TERPÉNICOS, EN ACEITE ESENCIAL DE HIERBA LUISA (*Cymbopogon citratus*), MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA UV - VISIBLE DERIVADA”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero e Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en nuestra condición de autores nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

f. 

Manuel Esteban Gómez Araujo

C.I: 1717079329

f. 

Viviana Alexandra Tito Gonzaga

C.I: 1722758404

Quito, octubre del 2017

Declaratoria de coautoría del docente tutor

Yo, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación “ANÁLISIS MULTIVARIADO DE COMPONENTES TERPÉNICOS, EN ACEITE ESENCIAL DE HIERBA LUISA (*Cymbopogon citratus*), MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA UV - VISIBLE DERIVADA” realizado por Manuel Esteban Gómez Araujo y Viviana Alexandra Tito Gonzaga, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, octubre 2017



Christian Fabricio Larenas Uría

C.I: 1705586046

Dedicatoria

A mis padres por concederme una buena educación y supieron guiarme en cada decisión que tomé, a mis hermanos por confiar en mí a cada momento, a Alejo por su amor y amistad incondicional y a toda mi familia por formar parte de este nuevo logro.

Viviana Tito

El presente trabajo lo dedico a mis padres por impulsarme a seguir estudiando y también a toda mi familia, amigos y docentes que me han brindado todo su apoyo durante este trayecto.

Esteban Gómez

Agradecimiento

A nuestro tutor Christian Larenas, por su predisposición y gran paciencia para enseñarnos y guiarnos durante nuestra investigación.

A nuestros docentes, que han sabido encaminar y orientar nuestros pasos durante toda la carrera.

A nuestros compañeros, que nos apoyaron en la elaboración de la parte experimental y agradecimientos especiales a los ingenieros Marco Ibarra, Edison Osorio, Erika Paredes y Michelle Parra por su apoyo y colaboración dentro del laboratorio.

Índice

Introducción	1
1 Marco conceptual.....	4
1.1 Hierba luisa (<i>Cymbopogon citratus</i>)	4
1.1.1 Características botánicas	4
1.1.2 Propiedades y Aplicaciones	5
1.2 Aceite esencial de Hierba luisa (<i>Cymbopogon citratus</i>)	5
1.2.1 Definiciones	5
1.2.2 Características	6
1.2.3 Composición fitoquímica	7
1.2.4 Análisis físico-químico	9
1.3 Espectroscopia Derivada	10
1.3.1 Definiciones	10
1.3.2 Aplicaciones	11
1.3.3 Propiedades de los espectros derivados	12
1.3.4 Ventajas y desventajas	14
1.3.5 Reglas de Woodward	16
1.3.6 Smoothing	17
1.4 Estadística multivariada	18
1.4.1 Definiciones	18
1.4.2 Análisis NMDS	19
1.4.3 Análisis Cluster: Neighbour Joining	21
1.4.4 Mínimos cuadrados parciales (PLS)	22
1.4.5 Medidas de Similitud	23
2 Metodología	25

2.1	Localización	25
2.2	Análisis físico-químico de aceites esenciales.....	25
2.3	Preparación de diluciones.....	26
2.4	Procedimiento Espectrofotométrico Derivado	27
2.5	Análisis estadístico	28
2.6	Interpretación de datos	28
3	Resultados y discusión.....	30
3.1	Selección e identificación de aceites esenciales.....	30
3.2	Análisis físico – químico de aceites esenciales	32
3.3	Lectura Espectrofotométrica Derivada.....	33
3.4	Datos disponibles de concentraciones de citral y α -pineno.....	36
3.5	Selección de longitudes de onda mediante el método PLS	38
3.6	Cálculo de λ máx. utilizando las reglas de Woodward	39
3.7	Interpretación de NMDS	40
3.8	Interpretación de Neighbour Joining Clustering (NJ)	45
	Conclusiones	51
	Recomendaciones.....	53
	Referencias.....	54
	Anexos	65

Índice de tablas

Tabla 1. Diluciones primarias y secundarias de aceites esenciales y estándares	27
Tabla 2. Identificación de aceites esenciales e índice de refracción	30
Tabla 3. Resultados del análisis sensorial e índice de refracción del aceite esencial	32
Tabla 4. Resultados de ensayos de solubilidad	32
Tabla 5. Concentraciones de citral y α -pineno obtenidos mediante GC-MS.....	37
Tabla 6. Longitudes de onda seleccionadas por método PLS	38
Tabla 7. Interpretación de bondad de ajuste del NMDS.	40

Índice de figuras

Figura 1. Espectros clásicos (D^0) y espectros derivados (D^n).....	13
Figura 2. Fórmula general de compuestos carbonílicos conjugados para las reglas de Woodward.....	17
Figura 3. Espectros derivados de primer a cuarto orden	35
Figura 4. Espectro depurado con la función smoothing.....	36
Figura 5. Cálculo de λ máx. del geranial con las reglas de Woodward	39
Figura 6. NMDS filtrada para 0D (datos espectrales originales)	42
Figura 7. NMDS filtrada para 1D (primera derivada).....	43
Figura 8. NMDS filtrada para 2D (segunda derivada)	44
Figura 9. NMDS filtrada para 3D (tercera derivada)	44
Figura 10. NMDS filtrada para 4D (cuarta derivada)	45
Figura 11. Neighbour Joining filtrado para 0D	46
Figura 12. Neighbour Joining filtrado para 1D	47
Figura 13. Neighbour Joining filtrado para 2D	48
Figura 14. Neighbour Joining filtrado para 3D	49
Figura 15. Neighbour Joining filtrado para 4D	50

Índice de anexos

Anexo 1. Gráfica de coeficientes estandarizados para los predictores de geranial y α -pineno.....	65
Anexo 2. NMDS Completa - 0D.....	66
Anexo 3. NMDS Completa - 1D.....	67
Anexo 4. NMDS Completa - 2D.....	68
Anexo 5. NMDS Completa - 3D.....	69
Anexo 6. NMDS Completa - 4D.....	70
Anexo 7. NMDS Parcial - 0D	71
Anexo 8. NMDS Parcial - 1D	72
Anexo 9. NMDS Parcial - 2D	73
Anexo 10. NMDS Parcial - 3D	74
Anexo 11. NMDS Parcial - 4D	75

Resumen

La presente investigación tiene como fin evaluar mediante análisis multivariado a la espectrofotometría ultravioleta – visible derivada como método científico viable para la determinación de componentes terpénicos en aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*). Se utilizó el equipo UV-VIS Spectrophotometer V-730 from JASCO, con longitudes de onda entre 400 y 190 nanómetros para la obtención de datos a partir de diluciones compuestas por aceite esencial y disolvente n-heptano en una relación de 1:500 y como estándares a los terpenos citral y α -pineno. El análisis derivativo de cada espectro se realizó mediante el software Spectra Analysis, desde el primer hasta el cuarto orden junto a un proceso de depuración. Estos datos se procesaron en el programa estadístico PAST versión 2.17c por medio de las técnicas NMDS o de Escalamiento Multidimensional No Métrico y por el clúster Neighbour Joining, que resultaron ser óptimas en el proceso de ordenación en cuanto a la información espectral de segunda derivada, ya que la formación de agrupaciones que presentaron en función de las concentraciones de citral y α -pineno permitieron interpretar el posible estado químico de cada aceite esencial, con un menor porcentaje de incertidumbre, con respecto a las demás derivadas y a los datos originales.

Palabras Clave: Espectrofotometría, *Cymbopogon citratus*, Análisis Multivariado.

Abstract

The aim of the present investigation is to evaluate the derivative ultraviolet-visible spectrophotometry as a viable scientific method for the determination of terpene components in essential oil of Lemon grass (*Cymbopogon citratus*). The UV-VIS Spectrophotometer V-730 from JASCO was used, with wavelengths between 400 and 190 nanometers to obtain data from dilutions composed of essential oil and n-heptane solvent in a scale of 1:500, alsocitral and α -pinene as standards. The Spectra Analysis software was used to obtain derivatives of each spectrum, from the first to the fourth order along with a debugging process. These data were processed in the PAST statistical software program version 2.17c through the use of the NMDS or Non-Metric Multidimensional Scaling techniques and by the Neighbor Joining cluster, which proved to be optimal in the ordering process for the second derivative spectral information, since the formation of clusters that presented as a function of the concentrations of citral and α -pinene allowed to interpret the possible chemical status of each essential oil, with a lower percentage of uncertainty, in regard to the other derivatives and to the original data.

Keywords: Spectrophotometry, *Cymbopogon citratus*, Multivariate Analysis.

Introducción

Los aceites esenciales son mezclas complejas de composición variable cuyo uso es de suma importancia para la industria cosmética, farmacéutica y alimenticia a nivel global (Del Pozo Espinosa, 2006). La hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) es una especie vegetal muy conocida por sus propiedades medicinales y aromáticas (Worwood & Worwood, 2012), por lo que es utilizada en forma de droga seca, extracto fluido, tintura o aceite esencial en medicamentos de distintas categorías farmacológicas, destacando sus propiedades analgésicas, antiinflamatorias, antiasmáticas o expectorantes (Soto, Vega, & Tamajón, 2002). Sin embargo el aceite esencial es lo que más caracteriza esta especie, ya que su compuesto principal “citral” es el material que provee las propiedades bactericidas y fungicidas (Tisserand, 2014) importante también en la perfumería, confitería, licores, síntesis de iononas y síntesis de vitamina A (Soto, Vega, & Tamajón, 2002).

Según Flores & Patiño (2016) existen diferentes quimiotipos en el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* que van variando en cantidad dependiendo de las condiciones en que se ha desarrollado la planta, los quimiotipos más importantes según (Loachamín & Loayza, 2016) varían en concentración de neral y geranial ya que sus valores son significativamente distintos, para estos estudios se ha aislado e identificado aceite esencial de raíces y hojas de *C. citratus*. Se define como quimiotipo a las alteraciones en la constitución química de los metabolitos secundarios en vegetales de la misma especie (Stashenko, Ruiz, Tunarosa, & Martínez, 2007).

Entre las diversas sustancias registradas por Negrelle & Gomes (2007), se encuentran: terpenos, alcaloides, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, saponinas, β sitosterol, flavonoides, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido p-cumárico y azúcares, por lo que Altamirano & Vásquez (2016) recomiendan que es indispensable evaluar cualitativa y cuantitativamente esta composición química, para tener datos indicadores de diversidad y así obtener mejores resultados en las distintas aplicaciones industriales.

La cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS) es la técnica analítica más empleada para conocer el perfil bioquímico de los aceites, sin embargo, es costosa y no está al alcance de pequeñas industrias que requieren un control de calidad continuo de las esencias destiladas (Rodríguez, Giraldo, & Murillo, 2011).

Por otra parte, la espectrofotometría UV-Visible también ha facilitado los análisis ópticos en investigaciones bioquímicas (Murillo & Méndez, 2007), es una técnica de relativo bajo costo, precisa, sensible y aplicable a moléculas de distinta naturaleza y estados de agregación (Brunatti & Martín, 2010), por lo que podría usarse asociada a técnicas estadísticas multivariantes o como técnica auxiliar para la determinación o clasificación de quimiotipos con base en sus propiedades espectrales (Hernández & González, 2002).

El presente trabajo tiene como objetivo principal investigar la capacidad analítica de la espectrofotometría UV-Visible derivada, asociada a técnicas estadísticas multivariantes, para la clasificación y/o caracterización de quimiotipos de aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) tomando como referencia tres

marcadores terpénicos, identificados previamente por cromatografía GC-MS en cuarenta muestras colectadas en diversos sectores del territorio Ecuatoriano.

Se considera el análisis de los terpenos isómeros del citral (geranial y neral) porque son los responsables del característico aroma y sabor de *Cymbopogon citratus*, además del alto valor terapéutico, medicinal y farmacológico (Soto, Vega, & Tamajón, 2002). Como tercer marcador se considera al α -pineno, debido a su destacada presencia en algunos de los quimiotipos analizados en la presente investigación.

Los espectros de orden cero y los espectros derivados de primer a cuarto orden se obtendrán de cada muestra dentro del intervalo de longitudes de onda UV-Visible, entre 400 y 190 nm. además de utilizarse mezclas de los aceites esenciales incorporando estándares internos de citral y α -pineno., para establecer relaciones entre los mismos mediante técnicas estadísticas de Análisis Multivariante que abarca el Análisis de Escalamiento multidimensional no métrico junto a otra técnica multivariante más tradicional como es el Análisis Cluster Neighbour Joining, de modo que pueda servir como complementaria o comparativa en la interpretación de resultados. Dichos métodos a emplear establecerán similaridad o disimilaridad entre el grupo de estudio mediante un análisis perceptual. Finalmente se agruparán los datos en matrices según la concentración y correlación a nivel de terpenos, para cada derivada.

1 Marco conceptual

1.1 Hierba luisa (*Cymbopogon citratus*)

1.1.1 Características botánicas

Cymbopogon citratus es una hierba gramínea perenne que crece en macollos compactos, tiene una altura de 0,5 a 2,0 m, su sistema radical se encuentra hasta los 0,3 m de profundidad en el suelo, las hojas tienen entre 30 y 100 cm de largo y de 1,0 a 1,5 cm de ancho (Tamajón Navarro, Soto Ortiz, & Vega Marre, 2002), tiene un ligero aroma a limón, por lo que la industria cosmética, alimenticia y farmacéutica utiliza las hojas y los tallos tiernos para la producción de aceite esencial cuyo contenido en hierba fresca es alrededor de 0,2 a 0,4 % pero puede alcanzar el 5,0 % (Antolinez González, G. de Colmenares, Usabillaga, Darghan, & Linares, 2008). *Cymbopogon citratus* se identifica con la siguiente jerarquía taxonómica según Tamajón Navarro, Soto Ortiz, & Vega Marre (2002):

Reino:	Cormobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Liliatae (Liliopsida)
Sub-clase:	Commelinidae
Orden:	Cyperales
Familia:	Poaceae (Gramíneas)
Género:	<i>Cymbopogon</i> Spreng
Especie:	<i>citratus</i> Stapf

1.1.2 Propiedades y Aplicaciones

Las plantas medicinales ofrecen beneficios tanto en estado natural, como en productos elaborados. *Cymbopogon citratus* es una de las especies medicinales más utilizadas por sus múltiples usos terapéuticos (Escalona Cruz, 2015).

Entre sus propiedades atribuidas en la medicina tradicional hay algunas que pueden relacionarse con acciones analgésicas, antipiréticas (Gbenou, y otros, 2013), antiinflamatorias, antiasmáticas, antiespasmódicas, antimicrobianas (Guerra Ordóñez, Rodríguez Jorge, García Simón, & Llerena Rangel, 2004), antifúngicas, antiulcerosas, antiherméticas, anticardiopáticas, antitérmicas, ansiolíticas, antitusígenas y antisépticas (Shah, y otros, 2011), cada una de estas propiedades se debe al aceite esencial rico en compuestos terpénicos y sus derivados, que están asociados con la presencia de citral y sus isómeros geranial (trans-citral) y neral (cis-citral), siendo una planta muy apreciada en la industria alimenticia para la elaboración de saborizantes y aromatizantes, en la industria farmacéutica para preparaciones sólidas y líquidas, en la industria cosmética para la elaboración de perfumes, cremas, jabones y detergentes, en la industria de productos de limpieza para la elaboración de desinfectantes del hogar y en la agroecología para la elaboración de repelentes contra insectos y para controlar el ataque de hongos fitopatógenos.

1.2 Aceite esencial de Hierba luisa (*Cymbopogon citratus*)

1.2.1 Definiciones

Existen numerosas definiciones para aceites esenciales, con diferentes puntos de vista que abarcan perspectivas químicas, botánicas o industriales. Sin embargo, de forma general se puede definir a los aceites esenciales, como aceites etéreos con metabolitos

vegetales, compuestos generalmente por terpenos que asociados a otros componentes, generan el olor de dichos vegetales (Mérida Reyes, 2012).

En el libro Estudio del Mercado Colombiano de Aceites Esenciales, publicado por el Instituto de Investigación de Recursos Biológicos “Alexander Von Humboldt” (2003) se define un aceite esencial de forma más precisa, como:

“Mezcla de componentes volátiles productos del metabolismo secundario de las plantas en cuya composición interviene una porción de hidrocarburos de la serie polimetilénica del grupo de los terpenos que responden a la fórmula $(C_5H_8)_n$ junto con otros compuestos casi siempre oxigenados (alcoholes, ésteres, éteres, aldehídos y compuestos fenólicos) que son los que transmiten a los aceites el olor que los caracteriza” (pág. 12)

1.2.2 Características

El aceite esencial de *C. citratus* se extrae por hidrodestilación o por arrastre de vapores de las hojas. Este aceite a temperatura ambiente es fluido con consistencia oleosa, su color varía de amarillo a carmelita rojizo (Guerra Ordóñez, Rodríguez Jorge, García Simón, & Llerena Rangel, 2004), presenta un aroma fuerte similar al limón, es soluble en alcoholes de alta graduación y en solventes orgánicos apolares, presenta actividad óptica, su índice de refracción es elevado alrededor de 1,4888. Se oxida con facilidad ya que es sensible a la exposición de la luz y el aire, tiene una densidad relativa igual a 0,8861 que puede aumentar mientras transcurre el tiempo (Saldaña Medina & Torres Vintimilla, 2012).

“La calidad e intensidad de los aceites esenciales varían debido a las condiciones de cultivo, variedad de la planta, época de recolección, parte cosechada de la planta, manejo del material vegetal y métodos de extracción” (Angulo Flórez, Cardona, Lozano Calderón, Montañez Pinzón, & Salcedo Osorio, 2014, pág. 24).

1.2.3 Composición fitoquímica

El aceite esencial de *C. citratus* posee en su mayoría compuestos terpénicos volátiles como los terpenoides y los hidrocarburos terpénicos (Saldaña Medina & Torres Vintimilla, 2012). Además de una variedad de fenoles aromáticos, ácidos fenólicos, fenilpropanoides, saponinas, oligoelementos, sustancias antioxidantes, óxidos, éteres, alcoholes, esterres, aldehídos y cetonas que determinan el aroma y el olor característico de la planta (Mendoza Meza & Taborda, 2010). También se componen por sustancias no volátiles, como los polifenoles que incluyen flavonoides y taninos, el ácido cafeico, la fructuosa y la sacarosa. Sus propiedades medicinales se deben a cada uno de estos componentes (Lima, y otros, 2008).

1.2.3.1 Compuestos terpénicos

Son compuestos orgánicos derivados del isopreno (2-metilbuta-1,3-dieno) y pueden o no tener oxígeno. Cuando poseen oxígeno se denominan terpenos funcionalizados o compuestos terpenoides con función alcohol, fenol aldehído cetona, éter, éster o peróxido, mientras que cuando carecen de oxígeno se denominan hidrocarburos terpénicos que pueden ser aromáticos o alifáticos como los monoterpenos (C₁₀), los sesquiterpenos (C₁₅) y el fenilpropano (Saldaña Medina & Torres Vintimilla, 2012).

Los compuestos terpenoides son los que predominan en el aceite esencial de *C. citratus* (Antolinez González, G. de Colmenares, Usubillaga, Darghan, & Linares, 2008), (Alzate, Mier, Alfánador, Durango, & García, 2009), su composición fitoquímica es:

- **Aldehídos:** Presentan propiedades antiinflamatorias, antivirales, sedativas y antisépticas, se ha identificado dentro de este grupo a furfural, citronellal (2,10%), geranial (40-62%) y neral (25-38%) (Shah, y otros, 2011), estos dos últimos en conjunto forman el citral que es considerado el componente principal ya que posee una concentración que varía entre 40,7% y 75,4% (Barbosa, y otros, 2008), que incluso puede superar los 82,42% (Linares, González, Gómez, Usubillaga, & Darghan, 2005).
- **Cetonas:** Propiedades mucolíticas y citofilácticas, el más representativo es Metilheptenona (0,2%)
- **Esteres:** Propiedades antifúngicas, calmantes y antiespasmódicas. Agrupa a acetato de linalilo (2,3%), acetato de geranilo (0,83%), geranilo, acetato de citronelilo, acetato de terpinilo, formiato de linalil, éster laurato, capanoato de geraniol (trazas).
- **Alcoholes:** Propiedades antisépticas, tonificantes, antivirales, diuréticas. Los principales componentes son: geraniol (1,5-10,4%), linalool (1,2%), nerol (4,18%), terpineol (0,45%), citronelol (0,1%) (Shah, y otros, 2011), eucaliptol, metheptanol, mentol, neomentol, octacosanol, dotriacontanol, triacontanol.
- **Ácidos fenólicos:** Propiedades antisépticas, inmunoestimulantes, aromatizantes, analgésicas, anestésicas por ejemplo, el ácido cafeico y el ácido cumárico.
- **Monoterpenos:** Principalmente myrceno (27,04 %) y limoneno (0,3-5%) (Gbenou, y otros, 2013).

- **Triterpenos:** Cymbopogona y cymbopogonol (Saldaña Medina & Torres Vintimilla, 2012).
- **Sesquiterpenos:** Trazas de α -pineno (0,07%), β -pineno (0,04%) (Shah, y otros, 2011) y alfa-cariofileno.
- **Flavonoides:** Propiedades antihemorrágicas, antiarrítmicas, antiinflamatorias, antihepatotóxicas, antimicrobianas, antiespasmódicas, diuréticas y antireumáticas. Se ha identificado trazas de luteolin y orientin.

1.2.4 Análisis físico-químico

La composición química y las características físicas de los aceites esenciales son importantes para determinar la calidad del aceite, los parámetros que generalmente se analizan son: características organolépticas, densidad relativa, solubilidad, índice de refracción y perfil bioquímico (Quirantes, Domínguez, Segura, & Fernández, 2016).

Las características organolépticas son aquellas que podemos percibir a través de los sentidos, mediante los cuales se pueden definir: color, olor, sabor, apariencia, textura, etc (Meza & Vargas, 2013). Para la densidad relativa se usa un picnómetro o un densitómetro electrónico a 20-25°C (Albarracín & Gallo, 2003) que determina la relación entre la masa de un volumen establecido y la masa de un volumen igual al agua. Cuando se requiere evaluar la solubilidad, un método simple de dilución es suficiente, varios autores indican que los aceites esenciales son insolubles en agua y miscibles en alcoholes y en disolventes orgánicos (Bandoni, 2000).

El índice de refracción de un aceite esencial con respecto al aire, corresponde a la relación entre el ángulo de incidencia y el ángulo de refracción emitido por un rayo de

luz (García S. , 2010). Para su medición se utiliza un refractómetro a una temperatura constante que esté entre 20-25°C (NTE INEN-ISO 6320, 20113) en donde se observa una separación nítida entre dos campos (claro y oscuro) de forma centrada en el cruce de dos líneas. Los análisis químicos van de la mano con los métodos cromatográficos y espectroscópicos, que tienen la ventaja de ser más rápidos, completos y sensibles (Leal, 2013).

1.3 Espectroscopia Derivada

1.3.1 Definiciones

La espectrofotometría o espectroscopia electrónica ultravioleta – visible (UV-Vis) es un método instrumental que determina la distribución de los electrones π en las moléculas (Carey & Giuliano, 2014). Es una herramienta indispensable que utilizan los químicos analíticos para el análisis cuantitativo de la composición de una muestra o para la determinación de la concentración de numerosos productos de una solución, por lo que se convierte en un método ampliamente usado en los laboratorios de control de procesos industriales y análisis químicos como la elucidación de estructuras de compuestos orgánicos muy conjugados (Levine, 2004).

Según Ríos, Moreno, & Simonet (2012) la espectrofotometría es la medida de la cantidad de energía radiante absorbida por las moléculas de una muestra, en función de las longitudes de onda específicas (λ). La zona UV-Vis ocupa un intervalo de longitudes de onda relativamente pequeño entre 100 y 800 nanómetros (*nm*) dentro del espectro de la radiación electromagnética.

Aunque este método posee precisión, simplicidad operacional, elevada velocidad analítica, bajo costo y posibilidades de uso en sistemas de control on-line, presenta problemas de interferencia espectral, limitando en algunos casos sus aplicaciones (Aguilera-Rodríguez, 2016). Sin embargo, para mitigar la baja selectividad en la región UV-Vis se utiliza el método derivativo denominado espectroscopía de derivadas, técnica empleada para solucionar aquellos sistemas en donde diferentes analitos absorben en zonas cercanas, con la finalidad de aumentar la estructura fina de las curvas o bandas espectrales, que se pueden representar por una función matemática, dicha función puede ser derivada n veces respecto a una de sus variables, en este caso con respecto a la longitud de onda o frecuencia, obteniendo así la derivada de primer, segundo, tercer,..., u orden n . En resumen, se trata de la “representación gráfica de la pendiente del espectro normal a cada longitud de onda en el intervalo medido” (Amézquita López & Mendoza Olivares, 2008, pág. 27).

1.3.2 Aplicaciones

La espectroscopía de derivadas mejora la sensibilidad y la selectividad analítica en tratamientos cuantitativos de los espectros de orden cero que normalmente son difíciles de detectar, también se usa para la localización de características espectrales complejas que muestran componentes mal resueltos y para la reducción de interferencias debidas a la absorción de fondo (López de Alba & López Martíne, 1993), por lo que se usa para resolver problemas de interés bioquímico, clínico, ecológico y farmacéutico, mediante el análisis de mezclas orgánicas e inorgánicas.

1.3.3 Propiedades de los espectros derivados

Un espectro derivado según Gamboa (1991), es la representación gráfica del cociente diferencial en un intervalo determinado de longitudes de onda, siendo el valor de la n -ésima derivada:

$$D^n = \frac{d^n A}{d\lambda^n}$$

Ecuación 1

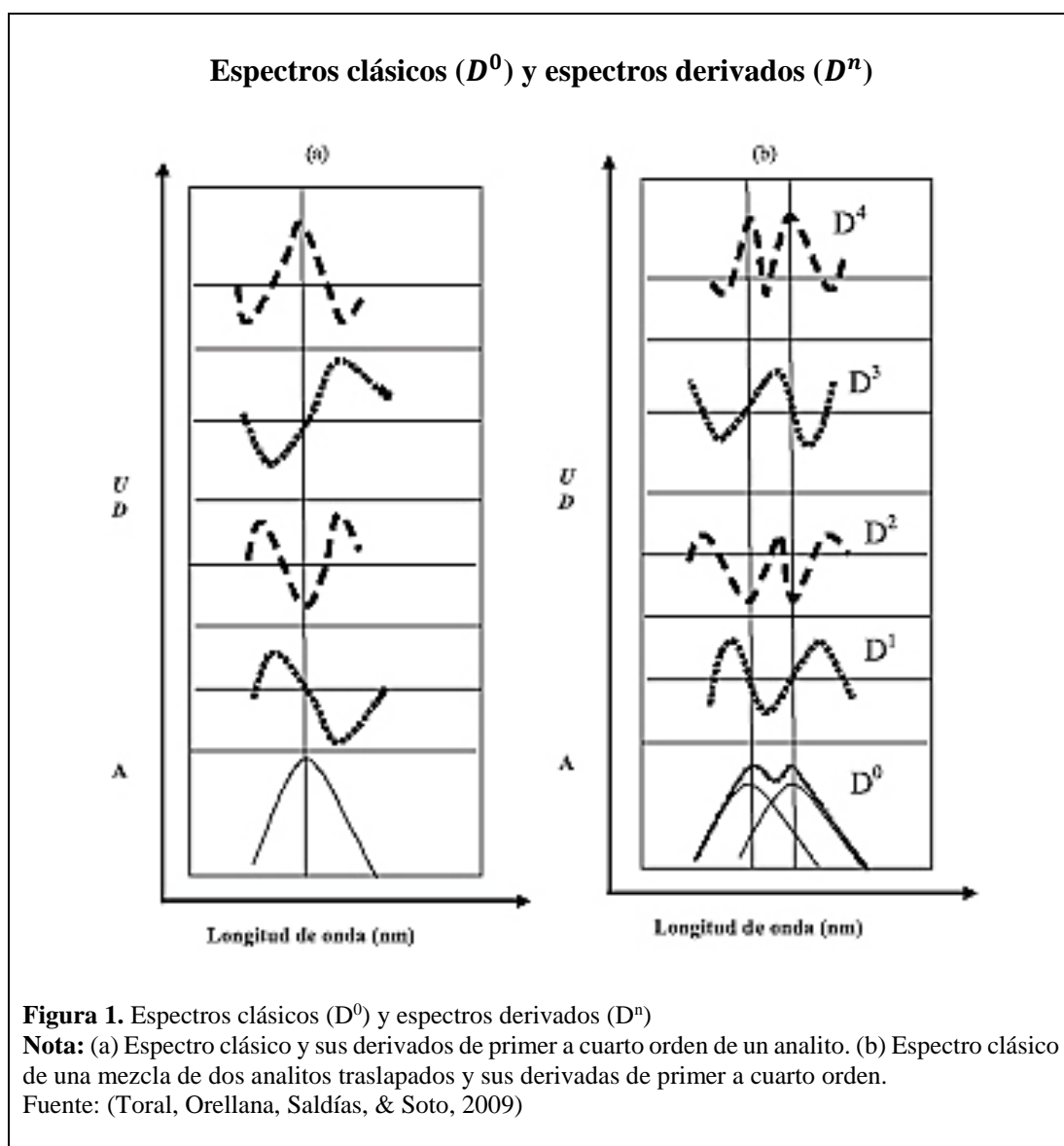
Donde A: absorbancia y λ : longitud de onda.

Los espectros clásicos o de orden cero son transformados en datos mediante un convertidor analógico digital, luego con un software son derivados y transformados en espectros (Torral, Lara, Gomez, & Richter, 2001). Poseen dos puntos de inflexión y un máximo de absorción a longitudes de onda características que son independientes de la concentración (López de Alba & López Martínez, 1993).

La primera derivada tiene una banda positiva y una negativa de absorción simple que posee un máximo y un mínimo originados por los puntos de inflexión del espectro clásico. La posición del máximo denominada valor cero, cruce-cero o zero crossing, se utiliza cuando se trata de picos anchos. En la segunda derivada los puntos de inflexión del espectro clásico se convierten en dos máximos, llamados satélites, y el máximo de absorción, se convierte en un mínimo, esta derivada provee mayor información de la estructura fina del espectro, pero con baja sensibilidad. La tercera derivada presenta un mínimo seguido de un máximo, donde el cruce cero coincide con el máximo de absorción del espectro clásico. La cuarta derivada solo presenta un

máximo que coincide con el máximo de absorción del espectro clásico (Torál, Orellana, Saldías, & Soto, 2009).

En la **Figura 1** es posible diferenciar los espectros clásicos de los espectros derivados de primer hasta cuarto orden, en función de la longitud de onda.



1.3.4 Ventajas y desventajas

La espectroscopía de derivadas tiene varias ventajas con el objetivo de extraer información cualitativa y cuantitativa de espectros que poseen bandas no resueltas o solapadas.

- **Obtiene la medida exacta de λ máx.:** Para determinar la posición exacta de los máximos de absorción se utiliza por lo general la derivada de primer orden, porque estas λ máx. están determinadas por el punto de corte entre el espectro y el eje de las abscisas (Amézquita López & Mendoza Olivares, 2008).
- **Aumenta resolución espectral:** La espectroscopía funciona como una especie de filtro que incrementa la sensibilidad y la selectividad, permitiendo una resolución directa sin tener que efectuar separaciones, es muy útil para la detección de características espectrales de componentes no resueltos ya que reduce la interferencia del ruido de fondo (background) y resuelve las anchas bandas obtenidas en los espectros UV-Vis (Gamboa, 1991). Se manifiesta mejor en la segunda derivada que en la primera, porque los máximos y mínimos del espectro convencional y de la segunda derivada aparecen prácticamente a las mismas longitudes de onda (Amézquita López & Mendoza Olivares, 2008). La estructura fina del espectro mejora efectivamente la resolución, a medida que se separan dos o más componentes con espectros superpuestos (Rodríguez A. , 2001).
- **Reducción de turbidez:** Los problemas turbidez, color intenso o bajas concentraciones, afectan el espectro de absorción ya que la luz no se dispersa de forma correcta (Lago & María, 1995), cuando una disolución es turbia aumenta la absorbancia en las longitudes de onda más cortas, por lo que la

primera y segunda derivada no presentan diferencias, para esto se elimina el efecto de la absorción de fondo manteniéndola a un nivel razonable.

- **Determinaciones cuantitativas en sistemas multi-componentes:** la espectroscopía derivada permite la determinación cuantitativa aceptable de máximos solapados o estrechos, ya que en el espectro un componente objetivo de una mezcla se caracteriza por un pequeño pico, si se utiliza la espectroscopía convencional se puede cometer errores sistemáticos.
- **Reducción de errores por desplazamiento de línea base:** Un problema frecuente cuando se miden bajas absorbancias, es el desplazamiento de la línea base de una muestra a otra, producida por usar distintas celdas, por insignificantes errores en el paso de luz, por pequeñas burbujas presentes en las disoluciones o por el índice de refracción de cada muestra, sin embargo, todas estas variaciones se eliminan cuando se utiliza la espectrofotometría derivada.

En cuanto a desventajas, hay que tomar en cuenta que estas aumentan con el orden derivado por lo que se encuentran las siguientes dificultades:

- **Discriminación de bandas:** Este efecto es muy importante en el proceso derivado ya que las bandas anchas son suprimidas en relación con las bandas agudas, esta supresión aumenta con el orden creciente derivado (Patel, 2010).
- **Eliminación de fondo:** Un efecto común no deseado en la espectroscopia, es el cambio de línea de base (Thangabalan, 2012), por lo que es necesario un filtrado de la señal resultante, aumentando el ruido.
- **Disminución de relación señal/ruido:** Esta relación disminuye a medida que se utilizan órdenes superiores de derivadas, utilizando técnicas de suavizado o

filtrado (Patel, 2010), esto se deduce del efecto de discriminación y del hecho de que el ruido siempre contiene las características más nítidas del espectro.

- **Supresión de la matriz:** Conjugas problemas como la dispersión, cambio de línea de base, o componentes de absorción no deseados. La combinación de dos o más de estos da como resultado una matriz de fondo de absorción amplia (Thangabalan, 2012).

1.3.5 Reglas de Woodward

Existen átomos que facilitan la absorción de energía para la transición electrónica denominados cromóforos, cuando estos se extienden, la longitud de onda de la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ se desplaza a la zona del visible, dando lugar al máximo de absorción (λ máx.). Con las reglas empíricas de Woodward es posible predecir la longitud de onda de la absorción (λ máx.) UV-Visible en compuestos orgánicos insaturados conjugados como las enonas, dienonas y análogos (Cifuentes Mendez, 2013).

Dada la aditividad de los sustituyentes las reglas funcionan bastante bien, obteniendo valores de longitud de onda muy aproximados, que generalmente solo difieren 2 o 3 nm de los valores experimentales, además se debe tomar en cuenta que las moléculas en estado excitado interaccionan con las moléculas del disolvente, por lo que estas reglas sirven tan solo para orientar (Olsen, 1990).

Las reglas empíricas se ajustan a cuatro tipos de compuestos como: 1. Dienos conjugados y trienos cíclicos, 2. Aldehídos y cetonas insaturados, 3. Anillos bencénicos sustituidos y 4. Ácidos, ésteres, nitrilos y amidas insaturados.

Según (Olsen, 1990) se siguen las siguientes reglas para los compuestos carbonílicos insaturados, que presentan la fórmula general que se observa en la **Figura 2**:

- Asignar el valor base de 215 nm a la cetona α , β insaturado y 208 nm al aldehído α , β insaturado
- Sumar 30 nm por cada doble enlace conjugado adicional
- Sumar 10 nm por un sustituyente alquilo en α
- Sumar 12 nm por un sustituyente alquilo en β
- Sumar 18 nm por un sustituyente alquilo en γ o posiciones más lejanas
- Sumar 5 nm por cada doble enlace exocíclico
- Sumar 39 nm si existe un dieno

Estas reglas están en función del etanol o metanol. La utilización de otro solvente requiere corrección por ejemplo, para hexano y ciclohexano -11 nm, eter -7 nm, dioxano -5 nm, cloroformo -1 nm y agua + 8 nm (Diaz, 2011).

Fórmula general de compuestos carbonílicos conjugados

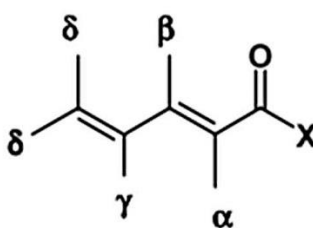


Figura 2. Fórmula general de compuestos carbonílicos conjugados para las reglas de Woodward
Nota: El grupo carbonilo C=O forma parte de aldehídos y cetonas. Fuente: (QUIORED, 2002)

1.3.6 Smoothing

El proceso de Smoothing, también conocido como “alisado” o “suavizado” es una herramienta de procesamiento de señal utilizada para la eliminación de componentes

ruidosos de un espectro para poder mejorar la relación señal/ruido (JASCO, 2013). El método de suavizado más usado es el Savitzky-Golay smoothing, que mejora la apariencia visual del espectro (Martelo Vidal, 2014). Utiliza el algoritmo de ponderación descrito por Savitzky y Golay, cuya función de ponderación cambia dependiendo del ajuste de ancho de datos utilizado para suavizar (JASCO, 2013). Este algoritmo se basa en la regresión polinomial del grado k en una serie de valores (de al menos $k+1$) para determinar el valor suavizado para conservar la mayor parte de las características de la señal (Calle, Chasiluisa, Carajal, & Herrera, 2015).

1.4 Estadística multivariada

1.4.1 Definiciones

Las técnicas multivariantes han facilitado el análisis de grandes conjuntos de datos, convirtiéndose en los últimos años en el análisis más importante en las investigaciones. Se trata de métodos estadísticos y matemáticos, que analizan, estudian e interpretan conjuntos de datos que poseen varias variables sobre una muestra de individuos o unidades experimentales (Cuadras, 2007), siendo una variable la característica o atributo que se le mide a un individuo (Fernández, 2006), estas son homogéneas y están correlacionadas, sin que alguna predomine sobre las demás.

El método multivariante de dependencia se utiliza para determinar si un conjunto de variables independientes afecta a un conjunto de variables dependientes, para esto es importante establecer si las variables dependientes son cuantitativas o cualitativas.

Si la variable dependiente es cuantitativa se utiliza técnicas como: Análisis de Regresión, Análisis de Supervivencia, Análisis de la Varianza, o Correlación Canónica, por otro parte si la variable dependiente es cualitativa las técnicas que se

pueden aplicar son las siguientes: Análisis Discriminante, Modelos de Regresión Logística, o Diseño Experimental (Fernández, 2006).

El método multivariante de interdependencia no distingue entre variables dependientes e independientes, su objetivo es identificar qué variables están relacionadas, cómo lo están y por qué. Se clasifica según el tipo de datos que analiza sean estos métricos o no métricos. Si los datos son métricos se utilizan las siguientes técnicas: Análisis Factorial, Análisis de Componentes Principales, Escalas Multidimensionales, o Análisis Cluster, y si los datos son no métricos se pueden utilizar, además de las Escalas Multidimensionales y el Análisis Cluster, las siguientes técnicas: Análisis de Correspondencias y Modelos log-lineales (Salvador Figueras, 2000).

1.4.2 Análisis NMDS

El Escalamiento Multidimensional No Métrico es una técnica de reducción de datos, como lo es el análisis factorial o el análisis de componentes principales (Closas, y otros, 2013). Tiene por objetivo analizar el gradiente indirecto que produce la ordenación de una matriz de datos que no son normales o que están en una escala discontinua, disimilar o arbitraria, es decir trata de representar en un espacio geométrico de dimensiones reducidas las proximidades existentes entre un conjunto de objetos (Friedman, Hastie, & Tibshirani, 2009), transformando distancias, pero conservando las relaciones de proximidad entre los elementos del conjunto (Cuadras, 2007), de modo que si un individuo es similar a los objetos A y B la técnica colocará a estos objetos con una distancia muy pequeña en comparación con otro par de objetos. (Guerrero & Ramírez, 2012) especifican que en este modelo hay que tomar en cuenta un coeficiente denominado *stress* cuyo valor permita conocer la bondad del modelo,

es decir mientras mayor sea la diferencia entre las desigualdades y las distancias, mayor será el stress y por tanto peor será el modelo, teniendo así las siguientes interpretaciones propuestas por Kruskal:

0,2000 → Pobre

0,1000 → Mínimo razonable

0,0500 → Bueno

0,0250 → Aceptable

0,0000 → Excelente

De la misma forma proponen utilizar el coeficiente de correlación al cuadrado (RSQ) que brinda información de la variabilidad de los datos de partida, si son valores cercanos a 1 indican que el modelo es bueno y valores cercanos a 0 indican que el modelo es malo.

1.4.2.1 Ventajas y desventajas

NMDS es una técnica robusta, que conlleva varias ventajas entre las que se puede mencionar:

- NMDS permite, al igual que el PCA, reducir la dimensionalidad de los datos originales, al estar basada en rangos de distancias, tiende a linealizar las relaciones entre las mismas.
- El resultado de la ordenación se puede visualizar en un gráfico de ordenación. Posteriormente podemos relacionar los ejes resultantes de dicha ordenación con distintas variables para determinar de manera indirecta el efecto de éstas sobre la matriz de sitios x.
- Puede tolerar distancias pares y utilizar variables cuantitativas, semicuantitativas, cualitativas o mixtas.

- Esta técnica multivariante permite al investigador extraer abundante información de los datos disponibles.

A pesar de que NMDS es una técnica ampliamente utilizada para detectar gradientes en comunidades tiene las siguientes desventajas:

- NMDS posee cierta dificultad para alcanzar una solución estable única.
- Es una técnica relativamente compleja y requiere para su utilización un conocimiento profundo de sus fundamentos y condiciones de aplicabilidad (Closas, y otros, 2013).

1.4.3 Análisis Cluster: Neighbour Joining

El método Neighbour Joining (NJ) conocido como unión del vecino, es un método puramente algorítmico basado en distancias, que produce la unión o agrupamiento secuencial de los elementos más cercanos, tratando de minimizar la longitud total del árbol o clúster (Olivares, 2007).

Esta matriz de distancias, inicia con la agrupación de los dos taxones que poseen la menor distancia, en el punto medio entre ambos se crea un nodo interior para considerarlos como un único taxón, luego se calculan las distancias entre este nuevo taxón compuesto y el resto de los taxones. Este proceso de agrupamiento se repite sucesivamente con todos los taxones, creando cada vez una nueva matriz reducida, hasta formar el árbol final (Rodríguez Tello, 2013).

1.4.3.1 Ventajas y desventajas

En comparación con otros métodos se ha demostrado que NJ es muy eficiente ya que posee varias ventajas como:

- Proporciona una solución óptima que solamente refleja el grado de similitud de los terminales, aquí individuos pertenecientes a una misma especie podrán formar grupos aislados debido a su alto nivel de semejanza (Peña, 2011).
- Es un método que construye árboles de una forma rápida, por su algoritmo de tiempo polinomial es adecuado para grandes conjuntos de datos
- Es estadísticamente consistente.

A pesar de ser un método simple con buena exactitud, posee desventajas como:

- No puede encontrar un ancestro común ya que la salida final es un árbol no enraizado, por lo tanto, no refleja relaciones evolutivas.
- Reduce la información para generar un único árbol, de varios posibles y no necesariamente será el “árbol verdadero”.
- No puede encontrar topología verdadera ya que es un algoritmo de agrupamiento codicioso

1.4.4 Mínimos cuadrados parciales (PLS)

La regresión por mínimos cuadrados parciales o PLS (partial least squares), es una técnica discriminante que combina el análisis de componentes principales y la regresión múltiple con el objetivo de construir un modelo lineal con énfasis en el desarrollo de modelos predictivos (Valdéz Blanco, 2010). La regresión PLS construye un modelo estadístico que relaciona múltiples variables independientes con múltiples dependientes, reduciendo los predictores a un conjunto más pequeño de componentes

no correlacionados (De la Mata E., 2011). Tal como aduce Reyes Aguilar (2010, pág. 11) este análisis es útil en dos casos: cuando hay muchos factores, porque permiten predecir las variables respuesta y cuando existe multicolinealidad entre las variables predictoras, siendo ampliamente usado por ingenieros químicos y quimiométricos para modelar la relación entre mediciones espectrales que incluye muchas variables correlacionadas.

1.4.5 Medidas de Similitud

Las medidas de similitud son distancias con dimensiones que representan características de los objetos. Si esta distancia es pequeña, será alto el grado de similitud, por el contrario, si la distancia es grande será bajo el grado de similitud (Demey, Pla, Vicente-Villardón, Rienzo, & Casanoves, 2017). La similitud es subjetiva y depende en gran medida del dominio y la aplicación. Se debe tener cuidado al calcular la distancia entre las características que no están relacionadas. Los valores relativos de cada elemento deben ser normalizados, o una característica podría terminar dominando el cálculo de la distancia.

1.4.5.1 Distancia Gower

Se trata de una distancia que combina diferentes variables después de procesarlas (Salazar, 2000), para determinar el grado de similitud entre individuos; a los cuales se le han medido características cualitativas, cuantitativas y binarias (Esponda, Cabrera, Nualles, & Fernández, 2010). Se define como $d^2_{ij} = 1 - s_{ij}$ dónde:

$$s_{ij} = \frac{\sum_{n=1}^{p1} \left(1 - \frac{|x_{in} - x_{jn}|}{Gh} \right) + a + \alpha}{p1 + (p2 - d) + p3}$$

Ecuación 2

p1: número de variables cuantitativas continuas,
 p2: número de variables binarias,
 p3: número de variables cualitativas no binarias,
 a: número de coincidencias (1, 1) en las variables binarias,
 d: número de coincidencias (0, 0) en las variables binarias,
 α: número de coincidencias en las variables cualitativas no binarias
 Gh: rango de la n -ésima variable cuantitativa (Moreno, 2007)

1.4.5.2 Distancia Euclidiana

La distancia Euclidiana conocida simplemente como distancia, es la medida de proximidad que se usa con más frecuencia cuando los datos son densos o continuos. (Hanneman , 2001) representa esta distancia como la longitud de la trayectoria que conecta dos puntos, por ejemplo para los puntos $x = (x_1, x_2, \dots, x_n)$; $y = (y_1, y_2, \dots, y_n)$ en un espacio de n dimensiones, está dada por:

$$d(x, y) = \sqrt{(x_1 - y_1)^2 + (x_2 - y_2)^2 + \dots + (x_n - y_n)^2}$$

Ecuación 3

1.4.5.3 Distancia Manhattan

La distancia de Manhattan también llamada distancia rectilínea, métrica de taxi, distancia L, distancia de ciudad, o distancia de Minkowski, es una métrica en la que la distancia entre dos puntos es la suma de las diferencias absolutas de sus coordenadas cartesianas (Guerrero & Ramírez, 2012). Suponiendo dos puntos $A = (x_1, y_1)$ y $B = (x_2, y_2)$, la distancia Manhattan entre ellos es:

$$\text{Distancia Manhattan} = |x_1 - x_2| + |y_1 - y_2|$$

Ecuación 4

2 Metodología

2.1 Localización

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Química Instrumental de la Universidad Politécnica Salesiana en Quito, Ecuador, se utilizó 40 muestras de aceites esenciales de hierba luisa *Cymbopogon citratus* provenientes de distintas provincias del país: Azuay, Bolívar, Cañar, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, El Oro, Esmeraldas, Guayas, Imbabura, Loja, Los Ríos, Manabí, Morona Santiago, Napo, Pastaza, Pichincha, Santa Elena, Santo Domingo de los Tsáchilas, Sucumbíos, Zamora Chinchipe y Tungurahua, estos aceites fueron extraídos en los trabajos realizados por (Loachamín & Loayza, 2016), Altamirano & Vásquez (2016), Flores & Patiño (2016).

2.2 Análisis físico-químico de aceites esenciales

Para determinar la calidad de los aceites, se evaluó las siguientes características organolépticas: color, olor y apariencia. Para definir el solvente más idóneo que fue utilizado en toda la investigación espectrofotométrica, se realizó ensayos de solubilidad utilizando 5 mL de los solventes: etanol al 96%, acetonitrilo y n-heptano junto a 0,5 - 0,05 - 0,01 mL de una muestra de aceite esencial *C. citratus* seleccionada al azar. Para medir el índice de refracción se utilizó el refractómetro eléctrico ABBE_REF1 conectado a una corriente de agua que circulaba a través del prisma durante todo el proceso, para verificar el correcto funcionamiento del equipo se definió el índice de refracción del agua destilada. Por otro lado, se calentaron a baño maría las muestras hasta llegar a 25°C característica importante que mantiene los datos sin alteraciones, luego se colocó 0,2 mL (3 gotas) de aceite esencial en el prisma de medición hasta obtener el valor correspondiente al índice de refracción que aparece

cuando la línea límite entre los campos claro y oscuro está centrada. Para cambiar de una muestra a otra se limpió cuidadosamente el prisma con alcohol al 90%. El perfil bioquímico se puntualizó utilizando el método espectroscópico UV-Visible derivado.

2.3 Preparación de diluciones

Se seleccionó el solvente orgánico alifático n-heptano $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_5 \text{CH}_3$ por presentar mejor miscibilidad en los aceites esenciales con relación al etanol y al acetonitrilo como se muestra en la [Tabla 4](#). N-heptano disuelve los terpenos y derivados apolares presentes en el aceite esencial de *C. citratus*, manteniéndolo transparente para que la radiación atravesase sin problemas y el análisis espectrofotométrico en la región UV-Vis sea óptimo.

Para las diluciones primarias o controles (A, B, C) se tomó 10 μL ya sea de las 40 muestras de aceite esencial de *C. citratus* (A), así como de los estándares (B, C) citral y α -pineno respectivamente, cada una de estas aforada a 5 mL del disolvente n-heptano. Luego para las diluciones secundarias (D, E, F, G) se tomó los 5 mL antes preparados pertenecientes a las diluciones aceite-disolvente (A) y estándar-disolvente (B, C), junto con cuatro tratamientos utilizando concentraciones de 0,5; 1,0; 1,5 y 2,0 mL de la dilución estándar citral-disolvente (B), cada una de estas aforada a 10 mL del disolvente n-heptano. En la [Tabla 1](#) se resume todas las diluciones realizadas:

Tabla 1.

Diluciones primarias y secundarias de aceites esenciales y estándares

Código	Dilución		Total Citral
A	0,01 mL (Aceites E.)	5,00 mL (Heptano)	0 µL/ML
B	0,01 mL (Citral)		2 µL/mL
C	0,01 mL (α -Pino)		0 µL/mL
D	5,00 mL (A)	0,5 mL (B)	4,5 mL (Heptano)
	5,00 mL (B)		0,1 µL/mL
	5,00 mL (C)		1,1 µL/mL
E	5,00 mL (A)	1,0 mL (B)	4,0 mL (Heptano)
	5,00 mL (B)		0,2 µL/mL
	5,00 mL (C)		1,2 µL/mL
F	5,00 mL (A)	1,5 mL (B)	3,5 mL (Heptano)
	5,00 mL (B)		0,3 µL/mL
	5,00 mL (C)		1,3 µL/mL
G	5,00 mL (A)	2,0 mL (B)	3,0 mL (Heptano)
	5,00 mL (B)		0,4 µL/mL
	5,00 mL (C)		1,4 µL/mL

Nota: Resumen de las concentraciones empleadas para cada dilución, donde (A) representa a cada uno de los 40 aceites esenciales, (B) estándar Citral, (C) estándar α -Pino. (D, E, F, G) son diluciones secundarias que incluyen (A, B, C) con concentraciones de 0,5; 1,0; 1,5 y 2,0 mL de (B).
Elaborado por: Los Autores, (2017)

2.4 Procedimiento Espectrofotométrico Derivado

La técnica aplicada fue la espectrofotometría derivada, basada en el proceso de absorción de la radiación ultravioleta-visible. Se trabajó con longitudes de onda entre 190 y 400 nanómetros utilizando celdas de cuarzo, cada corrida se realizó en el software Spectra Measurement del equipo UV-VIS Spectrophotometer V-730 from JASCO. Mediante la función Spectra Analysis del software, se obtuvo derivadas de cada espectro, desde el primer hasta el cuarto orden, y se realizó un proceso de depuración con la función smoothing, finalmente se exportó los datos numéricos en archivos csv. para facilitar la compatibilidad con el programa estadístico PAST versión 2.17c. Desde el punto de vista solamente espectral, puede utilizarse el espectro clásico, la primera y la segunda derivada, siendo esta última la más común y conveniente ya

que provee una mejor estructura del espectro. Las terceras y cuartas derivadas suelen ser descartadas ya que la atenuación de señal que realiza el software aumenta el ruido del espectro, sin embargo para seleccionar la derivada que mejor se ajusta a nuestro enfoque se realizó la interpretación de cada una de ellas.

2.5 Análisis estadístico

El fundamento principal de la investigación fue realizar un análisis multivariado en el software estadístico PAST versión 2.17c (Hammer, Harper, & Ryan, 2013) para clasificar y observar las relaciones existentes entre los datos de las muestras de aceites esenciales obtenidos en los ensayos espectroscópicos derivados, en función de la cantidad de citral y α -pineno, este procedimiento se realizó utilizando el método de Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS) para representar en un plano cartesiano las proximidades de las muestras con los estándares, y el método Neighbour Joining para agrupar las muestras y los estándares según su semejanza, ambos métodos se realizaron con la medida de similitud Manhattan porque presentaron una correlación más notable y menos nivel de stress, en comparación con las distancias Euclideana y de Gower.

2.6 Interpretación de datos

Para la interpretación de los resultados, se tomó en cuenta que cada pico en los espectros representa la presencia de los elementos de interés que son los terpenos a una determinada longitud de onda. Se comparó las matrices de datos del geranial isómero principal del citral, con las matrices del estándar α -pineno, este proceso se realizó para cada derivada y con las longitudes de onda más significativas que se seleccionaron mediante predictores en el método multivariado PLS. Para corroborar

que los espectros dan información dentro de lo esperado, se determinó la longitud de onda que posee el máximo de absorbancia utilizando las reglas de Woodward.

El estándar α -pineno representó el punto de control en cada muestra de aceite esencial, ya que su presencia o ausencia, pudo clasificar las muestras en cuatro grupos: 1. Muestras que no poseían α -pineno o tenían trazas, 2. Muestras con cantidad baja de α -pineno, 3. Muestras con cantidad media y 4. Muestras con cantidad alta. La composición de la mayoría de aceites utilizados se obtuvo mediante un análisis cromatográfico GC-MS previo, para los aceites que no disponían de datos se hizo ensayos de predicción, y estos se representaron en un grupo 5. Para completar la matriz de correlaciones se incluyó en un grupo 6 los datos de citral de las diluciones secundarias como se observó en la [Tabla 1](#).

Para la interpretación NMDS se tomó en cuenta la ubicación de cada muestra en los cuatro cuadrantes espaciales y la proximidad que tuvieron con las diferentes concentraciones de citral, además se comparó el valor de stress y de RSQ que mostraron las tres distancias: Gower, Euclidean y Manhattan.

Para la interpretación Neighbour Joining se tomó en cuenta la proximidad y agrupación de las muestras en relación con las diferentes concentraciones de citral tomando en cuenta la [Tabla 1](#) y en relación con los colores que representan las concentraciones de α -pineno tomando en cuenta la [Tabla 5](#).

3 Resultados y discusión

3.1 Selección e identificación de aceites esenciales

Las muestras de aceite esencial *Cymbopogon citratus* se identificaron como se observa en la [Tabla 2](#), y para cada una se determinó el índice de refracción según lo especificado en el apartado 2.2.

Tabla 2.

Identificación de aceites esenciales e índice de refracción

Código	Provincia	Lugar	Índice de refracción
M1	Morona Santiago	Los Ángeles	1,488
M2	Morona Santiago	San Juan	1,483
M3	Bolívar	Agua Clara	1,484
M4	Tunguragua	Patate	1,488
M5	Pastaza	San Jacinto	1,483
M6	Los Ríos	La Sexta	1,479
M7	Cotopaxi	El Toquillal	1,494
M8	Tunguragua		1,488
M9	Chimborazo	Naranjal	1,489
M10	Chimborazo	Jiménez	1,488
M11	Guayas	La Guadalupe	1,490
M12	Guayas	Nobol	1,482
M13	Sucumbíos	Nueva Loja	1,478
M14	Pastaza	Mera	1,489
M15	Los Ríos	Quevedo	1,488
M16	Bolívar	Balsapamba	1,486
M17	Santa Elena	Buenos Aires	1,488
M18	Santo Domingo	El Poste	1,482
M19	Manabí	San Antonio	1,486
M20	Esmeraldas	Chigue	1,481
M21	Carchi	Mira	1,485
M22	Napo	Tena	1,492
M23	Pichincha	Chavespamba	1,486
M24	Sucumbíos	Piedra Blanca	1,481
M25	Esmeraldas		1,478

Código	Provincia	Lugar	Índice de refracción
M26	Pichincha	Guayllabamba	1,484
M27	Napo		1,490
M28	Napo		1,490
M29	Manabí	Tosagua	1,487
M30	Napo	Archidona	1,480
M31	Manabí		1,488
M32	Sucumbíos		1,486
M33	Imbabura	Carpuela	1,487
M34	Esmeraldas	Palestina	1,479
M35	Carchi	Mascarilla	1,485
M36	Loja, Azuay, Cañar, El Oro, Zamora Chinchipe		1,483
M37			1,486
M38			1,488
M39			1,480
M40			1,484

Nota: Aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* extraídos en los trabajos experimentales realizados por (Loachamín & Loayza, 2016), Altamirano & Vásquez (2016), Flores & Patiño (2016). La codificación y el índice de refracción son propios de la presente investigación.

Elaborado por: Los Autores, (2017)

Los aceites M8, M25, M27, M28, M31 y M32 estuvieron etiquetados con información solo de la provincia, más no del lugar exacto donde fueron recolectados por esta razón se omitió este dato en la **Tabla 2** para dichas muestras. De la misma forma, los últimos cinco aceites pertenecientes a las provincias de Loja, Azuay, Cañar, El Oro y Zamora Chinchipe estuvieron identificados individualmente.

Los índices de refracción de los aceites esenciales comparados con los valores especificados en la ficha técnica de la Fundación Chankuap (2009) corroboran la pureza de cada aceite ya que su promedio **Tabla 3** está entre dentro de los límites 1,480 – 1,500.

3.2 Análisis físico – químico de aceites esenciales

Los parámetros organolépticos y promedio de índices de refracción se muestran en la **Tabla 3**, la solubilidad con diferentes solventes se evalúa en la **Tabla 4**, y perfil bioquímico con espectrofotometría derivada se muestra a partir del apartado 3.3. Estos resultados coinciden con los descritos por la Fundación Chankuap (2009) y Del Pozo Espinosa (2006), siendo buenos indicadores de calidad y pureza de los aceites utilizados ya que se encuentran dentro de los parámetros establecidos.

Tabla 3.

Resultados del análisis sensorial e índice de refracción del aceite esencial

Parámetros	Resultados
Color	Verde - amarillento pálido
Olor	Intenso a limón
Apariencia	Líquido transparente, aceitoso
Índice de refracción a 25°C	1,485

Nota: Las características organolépticas fueron similares para todos los aceites esenciales y el valor de índice de refracción corresponde al promedio.

Elaborado por: Los Autores, (2017)

Tabla 4.

Resultados de ensayos de solubilidad

5 mL Solvente	Aceite esencial		
	0,5 mL	0,05 mL	0,01 mL
Etanol al 96%	Soluble	Soluble	Soluble
Acetonitrilo	Insoluble	Insoluble	Insoluble
N-heptano	Soluble concentrado	Soluble	Soluble Idóneo

Nota: Las características organolépticas: color, olor y apariencia fueron iguales para todos los aceites esenciales, el índice de refracción corresponde al promedio.

Elaborado por: Los Autores, (2017)

Un aceite esencial se disuelve por completo en alcohol etílico absoluto, sin embargo si se utiliza alcohol diluido como en este caso etanol al 96%, se debe considerar al menos una relación 1:2 de aceite, alcohol respectivamente (García R. , 2015) aunque en estos ensayos se tomó cantidades de aceite esencial muy pequeñas, la solubilidad si se efectuó pero formando emulsiones blanquecinas y turbias, porque se trata de aceites ricos en terpenos (Albarracín & Gallo, 2003) en donde el etanol actuó como una especie de jabón, impidiendo que la dilución sea óptima para una lectura posterior con luz UV-Vis.

Lo mismo ocurre con el acetonitrilo ya que es un solvente de polaridad mixta y aunque se lo utiliza para disolver sustancias orgánicas (Núñez, 2008), en este caso presentó la formación de emulsiones con apariencia muy turbia. El solvente orgánico más idóneo para este ensayo fue el n-heptano ya que presentó una alta miscibilidad en los aceites esenciales que son considerados compuestos orgánicos, corroborando así el método de análisis cualitativo de Kamm, que se basa en que “una sustancia es más soluble en un disolvente cuando sus estructuras están íntimamente relacionadas” (Laboratorio de Química Orgánica Aplicada, 2010).

Se seleccionó 0,01 mL de aceite esencial porque con esta cantidad se observó espectros bien definidos que en comparación con 0,5 mL el espectro mostró una línea constante sin definición de picos.

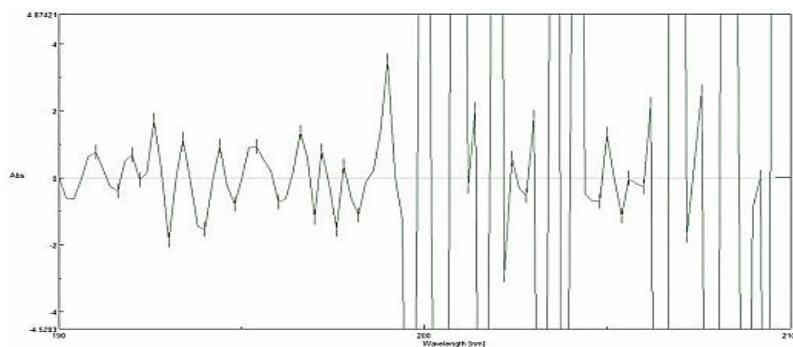
3.3 Lectura Espectrofotométrica Derivada

Los espectros originales codificados como 0D, que resultaron de cada corrida espectral UV-Vis fueron derivados hasta el cuarto orden (1D, 2D, 3D, 4D) como se muestra en

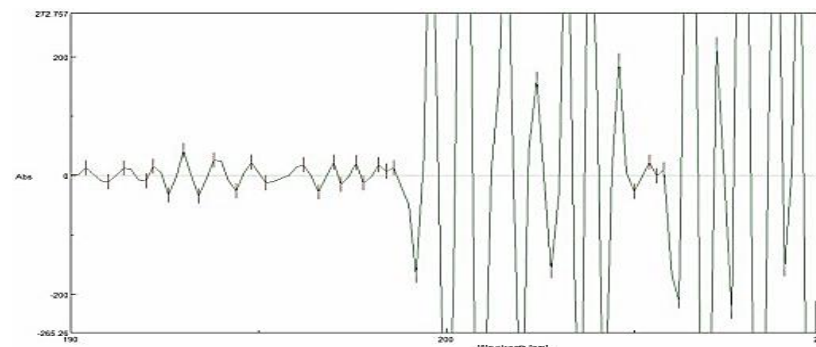
la [Figura 3](#), estos espectros derivados presentaron señales discontinuas debido a las grandes variaciones en su amplitud, por lo que se depuraron con la función smoothing como se observa en la [Figura 4](#) para filtrar este ruido y obtener un mejor efecto en el sentido visual, tal como lo recomienda Estévez Báez, Machado García, & Estévez Carrera (2008) es necesario suavizar los espectros, algo así como trazar a mano alzada su perfil para que respondan mejor a la modelación de señales sin degradar la información contenida en la misma. Debido a que este método se emplea con frecuencia en espectrofotometría, no se lo descartó del procedimiento.

Los espectros derivados presentaron datos de absorbancia en el eje de las ordenadas con su respectiva longitud de onda en el eje de las abscisas, dichas longitudes se establecieron inicialmente con un rango de 0,5 entre 190 y 400 nm obteniendo un total de 421 datos, sin embargo como todos los espectros presentaron señales muy bajas aproximadamente desde los 271 hasta los 400 nm, se consideró necesario eliminar dichos datos y aumentar el rango a 1 nm, ya que con el rango anterior los datos fueron muy similares, obteniendo en total 81 longitudes de onda.

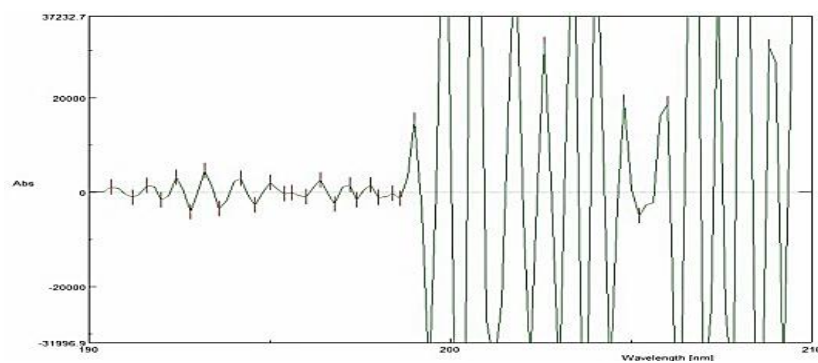
Espectros derivados



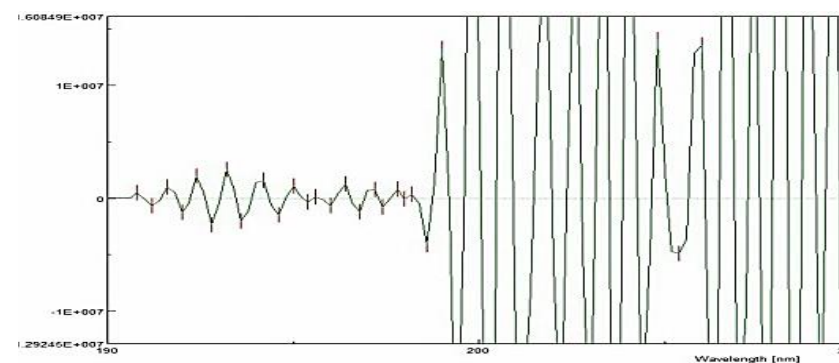
(a) Primera derivada – 1D



(b) Segunda derivada – 2D



(c) Tercera derivada – 3D

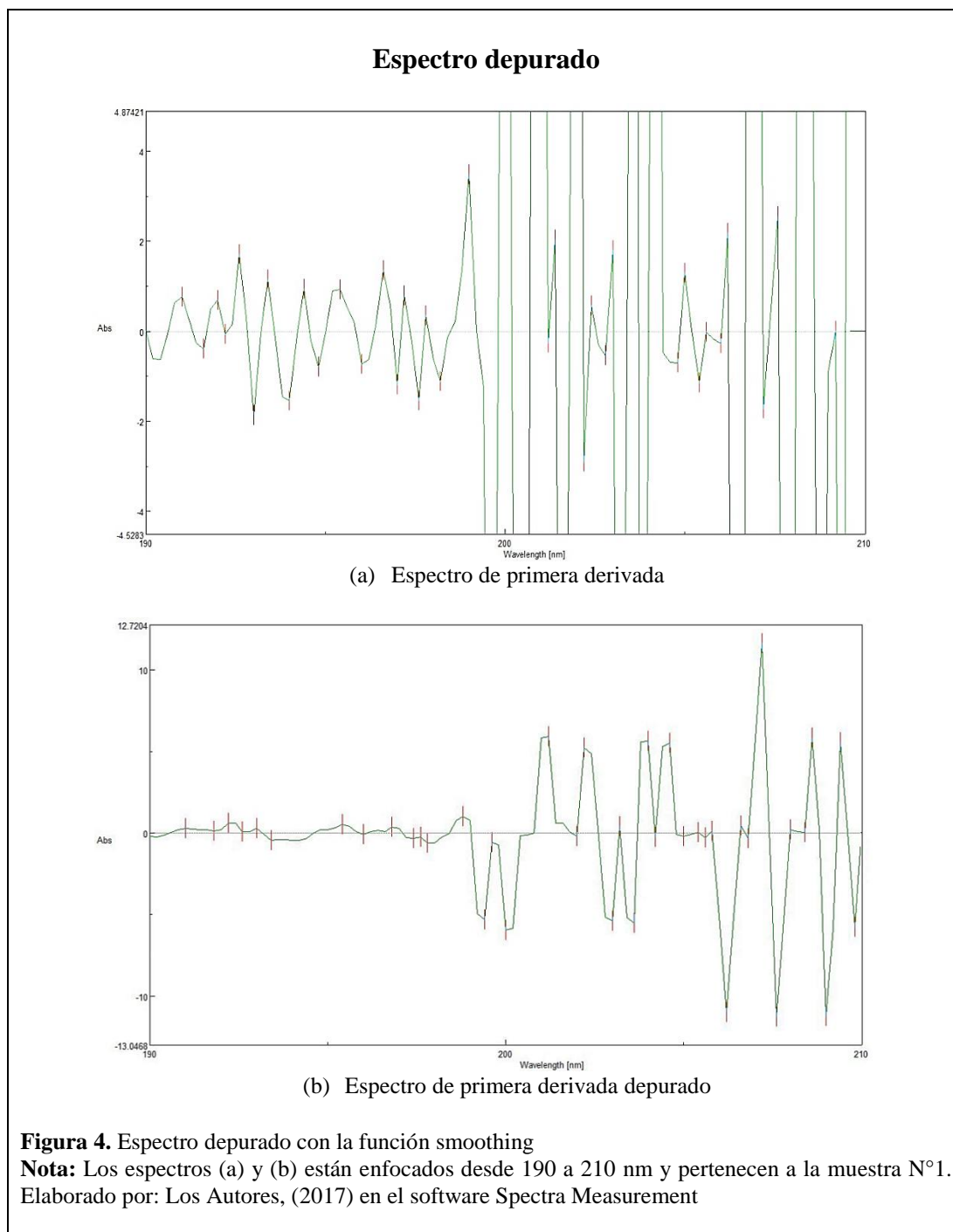


(d) Cuarta derivada – 4D

Figura 3. Espectros derivados de primer a cuarto orden

Nota: Los espectros pertenecen a la muestra N°1 sin depuración y están enfocados desde 190 a 210 nm en el eje x, con su respectiva absorbancia en el eje y.

Elaborado por: Los Autores, (2017) en el software Spectra Measurement.



3.4 Datos disponibles de concentraciones de citral y α -pineno

Las investigaciones realizadas por Altamirano, Vásquez, (Loachamín & Loayza, 2016), Flores & Patiño (2016) utilizando GC-MS, determinaron las concentraciones de citral y α -pineno para cada aceite como se muestra en la [Tabla 5](#).

Tabla 5.

Concentraciones de citral y α -pineno obtenidos mediante GC-MS

	Citral		α -Pineno	Citral Relativo		α -Pineno Relativo
	Neral	Geranial		Neral Relativo	Geranial Relativo	
M01	43,8824894	56,1175106	0,0000000	1,00	1,28	0,00
M02	45,4473299	54,5526701	0,0000000	1,00	1,20	0,00
M12	46,5388800	53,4611200	0,0000000	1,00	1,15	0,00
M13	64,5347157	35,4652843	0,0000000	1,82	1,00	0,00
M20	47,0980248	52,9019752	0,0000000	1,00	1,12	0,00
M22	49,9396883	50,0584027	0,0019090	1,00	1,00	0,00
M24	50,4064047	49,5928214	0,0007739	1,00	0,98	0,00
M26	44,4978836	55,5021164	0,0000000	1,00	1,25	0,00
M16	50,6366495	47,8434296	1,5199209	1,06	1,00	0,03
M06	45,2769588	52,2712167	2,4518245	1,00	1,15	0,05
M03	49,1697824	48,1258408	2,7043768	1,00	0,98	0,06
M05	46,4615549	50,1046755	3,4337696	1,00	1,08	0,07
M34	46,1223976	48,0324827	5,8451197	1,00	1,04	0,12
M35	42,6621666	50,1105892	7,2272442	1,00	1,17	0,14
M33	38,6308984	49,4385088	11,9305929	1,00	1,28	0,24
M17	52,3599576	34,0685526	13,5714898	1,54	1,00	0,26
M18	38,4948993	48,4429079	13,0621928	1,00	1,26	0,27
M21	37,5068668	48,8887014	13,6044318	1,00	1,30	0,28
M29	40,3144503	46,3257536	13,3597961	1,00	1,15	0,29
M07	36,6682088	48,0272745	15,3045167	1,00	1,31	0,32
M04	38,2666465	46,1523185	15,5810349	1,00	1,21	0,34
M19	42,8914632	41,6995276	15,4090093	1,00	0,97	0,36
M14	24,8046491	55,3057166	19,8896343	1,00	2,23	0,36
M30	37,2613453	44,0508595	18,6877952	1,00	1,18	0,42
M23	36,9067717	44,2138745	18,8793538	1,00	1,20	0,43
M15	44,4374976	35,6109369	19,9515655	1,25	1,00	0,45
M11	41,3886406	33,4453756	25,1659838	1,24	1,00	0,61
M10	26,8616946	45,2895781	27,8487274	1,00	1,69	0,61
M09	30,7432630	39,7860902	29,4706468	1,00	1,29	0,74

Nota: Se excluye de la tabla las muestras no identificadas y se ordena por colores según las concentraciones de α -Pineno.

Elaborado por: El docente Tutor Christian Larenas, (2017)

Estos datos se recolectaron porque fueron necesarios para el análisis PLS. Los colores facilitaron la identificación de α -Pineno en los análisis multivariados NMDS y Neighbour Joining, siendo el color azul – muestras sin pineno, amarillo – muestras con

bajo pineno que varían entre 0,01 - 0,15; fucsia – muestras con medio pineno que varían entre 0,20-0,45 y rojo – muestras con alta concentración de pineno entre 0,50 – 0,70.

3.5 Selección de longitudes de onda mediante el método PLS

Las concentraciones de los estándares geranial y α -pineno que se encuentran en la **Tabla 5**, junto con los valores de absorbancia de los espectros originales pertenecientes a las longitudes de onda entre 190 y 270 nm, determinaron varios predictores como se indica en los **Anexo 1 y 2**, de los cuales se seleccionó sólo 15 con mayor magnitud en valor absoluto. Cada predictor pertenece a una longitud de onda específica.

La **Tabla 6** indica que geranial absorbe fuertemente la luz en un rango entre 205 y 269 nm y α -pineno entre 211 y 267 nm, dichos valores son óptimos para el análisis multivariado NMDS y NJ, por ser datos representativos de mejor absorbancia, tal como Claudia A. De León Solís (2004) utilizó en su investigación, ya que demostró que los valores de máxima absorbancia a una determinada longitud de onda sirvieron correctamente para sus mediciones cuantitativas.

Tabla 6.

Longitudes de onda seleccionadas por método PLS

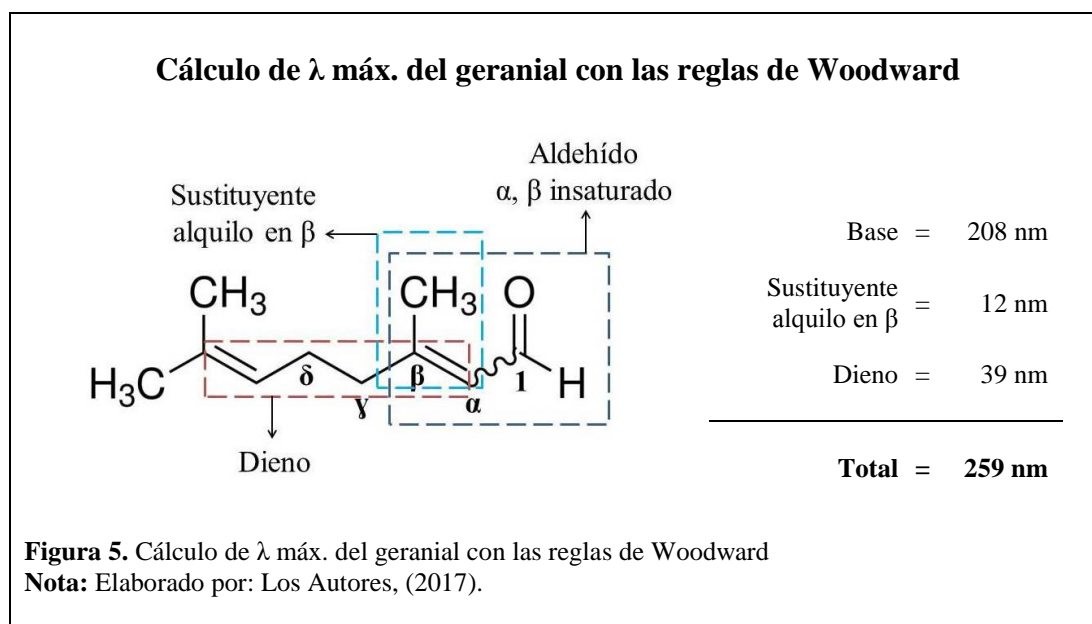
	Longitud de onda (nm)														
Geranial	269	268	266	265	264	262	261	260	259	243	240	228	227	226	205
α-Pineno	267	264	263	262	261	260	258	257	249	248	240	228	216	212	211

Nota: Elaborado por: los Autores, (2017)

3.6 Cálculo de λ máx. utilizando las reglas de Woodward

El cálculo teórico de la λ máx. del isómero geranial, que se encuentra en mayor cantidad en los aceites esenciales de *C. citratus*, fue un aproximado coherente a las longitudes de onda experimentales que se observan en la [Tabla 6](#), las variaciones son notorias ya que se trata de una mezcla compleja que contiene otros quimiotipos en cantidades menores, sin embargo se logró ratificar la hipótesis de que los espectros si dan información dentro de los valores estimados.

El cálculo se realizó como se observa en la [Figura 5](#), tomando en cuenta las Reglas de Woodward para compuestos carbonílicos conjugados que tienen la fórmula general que se presenta en la [Figura 2](#), en este caso para el aldehído α, β insaturado citral (geranial). El α -pineno no se ajusta a estas reglas.



La suma de los sustituyentes da un aproximado de 259 nm que significa que a esta longitud de onda se da el máximo de absorbancia, no se tomó en cuenta el n-heptano para realizar la corrección porque no existe referencia experimental de este solvente.

3.7 Interpretación de NMDS

Dado que el objetivo de NMDS es conseguir que las configuraciones dimensionales sean lo más parecidas posible, se comparó los indicadores de proximidad en la [Tabla 7](#) para tres medidas de similitud.

Tabla 7.

Interpretación de bondad de ajuste del NMDS.

Derivada	Gower		Euclidean		Manhattan	
	Stress	RSQ	Stress	RSQ	Stress	RSQ
0D	0,08778	0,9316	0,08339	0,8979	0,09022	0,9247
1D	0,2149	0,4520	0,2336	0,4447	0,2143	0,5141
2D	0,2371	0,4705	0,2279	0,4551	0,2371	0,4459
3D	0,2366	0,5226	0,2357	0,4681	0,2464	0,4729
4D	0,2003	0,5115	0,1878	0,4988	0,1917	0,5425

Nota: Valores de stress cercanos a 0 son excelentes y cercanos a 1 son malos. Valores de RSQ cercanos a 0 son malos y cercanos a 1 son excelentes. Los valores resaltados son los mejores en cada caso.
Elaborado por: Los Autores, (2017)

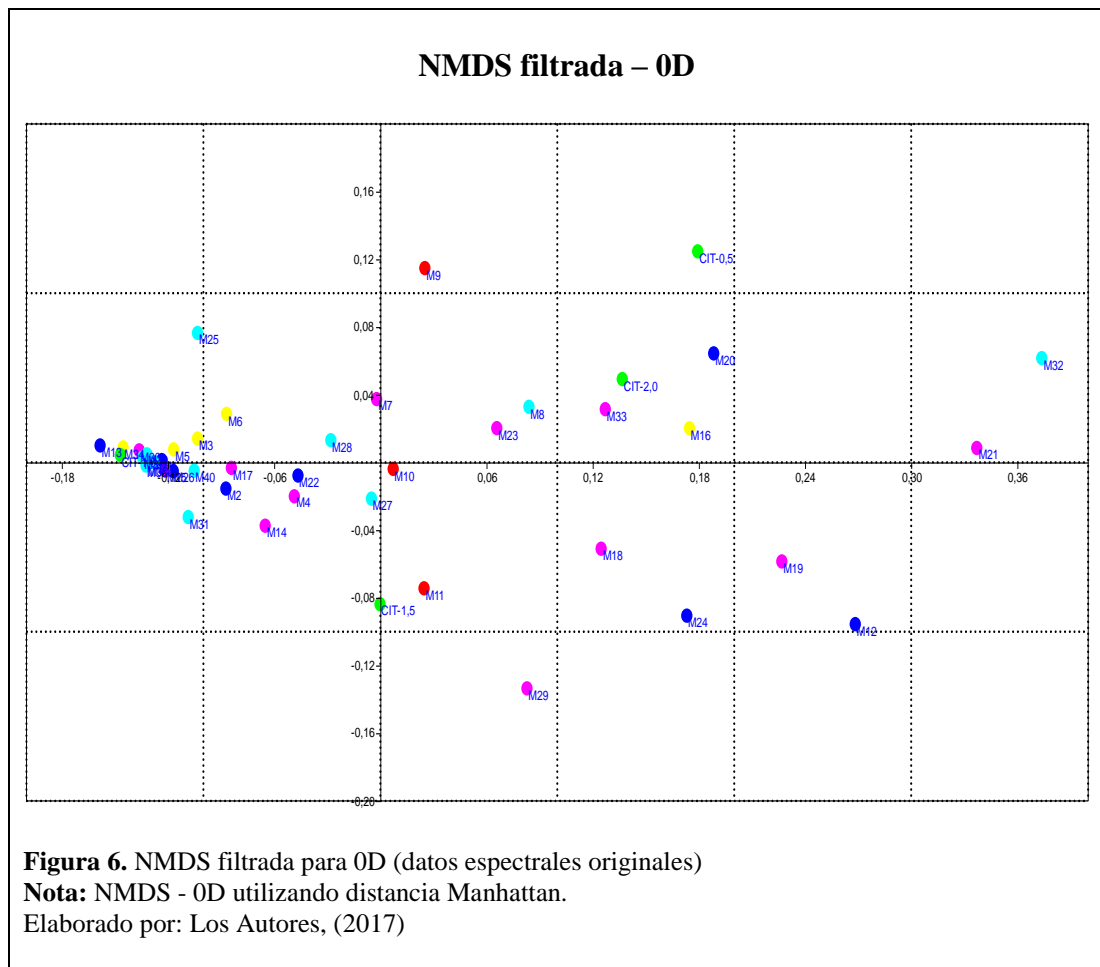
Las distancias Gower, Euclidean y Manhattan mostraron valores excelentes de stress y de RSQ en todos las derivadas, sin embargo, los resultados que se indican a continuación pertenecen únicamente a la distancia Manhattan, por ser la que mostró una separación más nítida de las muestras y sus valores de Stress y RSQ para la derivada 1D fueron los únicos que se correlacionaron.

En los primeros ensayos se utilizó además de los estándares citral y α -pineno, estándares denominados terpineol y eucaliptol pero se los excluyó de la investigación

porque además de no disponer de datos en cuanto a sus concentraciones, sus ordenaciones NMDS con datos derivados resultaron muy confusas en relación a cada muestra cómo se observa en los [Anexo 4, 5, 6, 7](#), dificultando la interpretación, pues el nivel de stress se alejó considerablemente de 0,0 siendo el método en este caso poco útil, aunque si se observa el [Anexo 3](#) que obtuvo un nivel de *stress* mínimo razonable se puede corroborar que dichos quimiotipos (Terpineol y Eucaliptol) al encontrarse distantes de las muestras, se encuentran en trazas en los aceites esenciales de *C. citratus*, y si se desea obtener una relación razonable se necesitaría aumentar su concentración en las diluciones.

Para las matrices definitivas, se decidió descartar también el estándar α -pineno y las muestras de aceites con concentraciones de 0,5; 1,0; 1,5 y 2,0 mL de citral, porque aún eliminando terpineol, eucaliptol y α -pineno se observó una ordenación acumulada de las muestras como se contempla en los [Anexo 8, 9, 10, 11](#), quedando únicamente para la interpretación final los datos de los aceites esenciales de las diluciones primarias y los datos del estándar citral de las diluciones secundarias en cuanto a la [Tabla 1](#).

Además se tomó en cuenta solo las longitudes de onda seleccionadas en el apartado 3.5 y se clasificó a cada muestra por colores en cuanto a la concentración de α -pineno de la [Tabla 5](#), representando el color azul a muestras sin pineno o con trazas, color amarillo - cantidad baja, color fucsia - cantidad media, color rojo - cantidad alta y color celeste - muestras sin información, estas últimas tomarán el valor de la concentración de citral y de α -pineno al que se encuentren más cercanas.

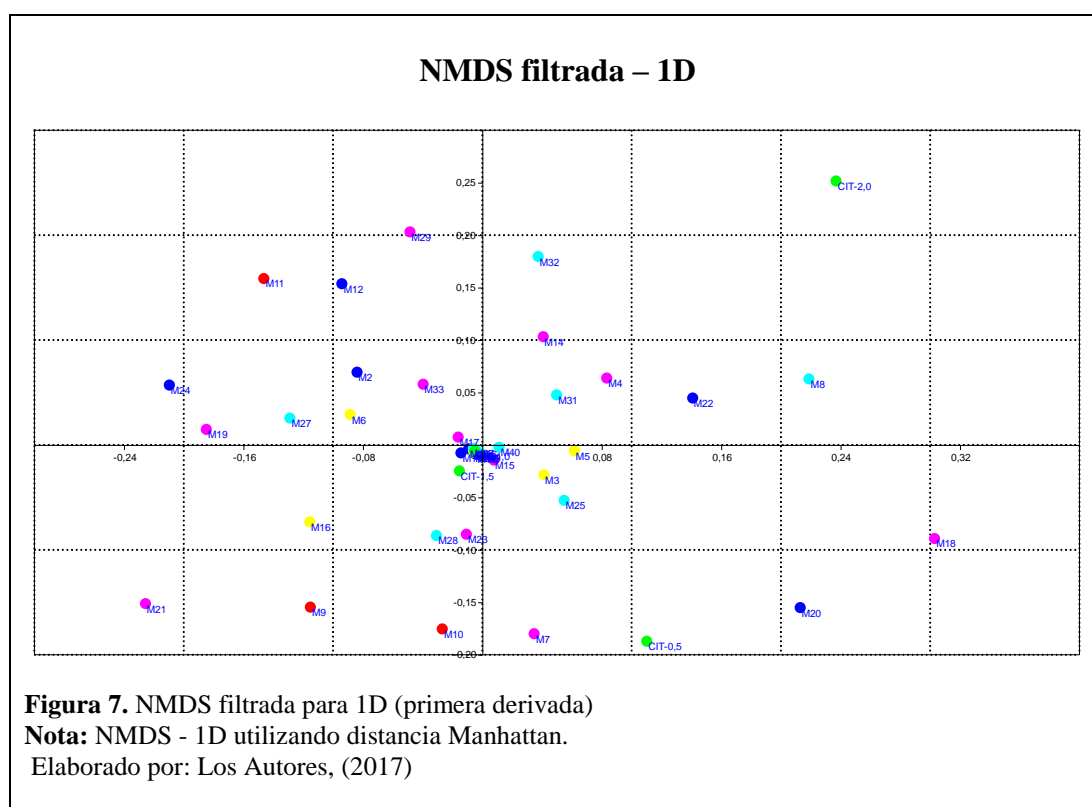


La **Figura 6** muestra la matriz NMDS con datos espectrales originales, codificados como 0D, la representación es discordante en cuanto a la proximidad entre los citrales 0,5 y 2,0 ya que se trata de concentraciones diferentes, infiriendo que esto se debe al poco poder discriminante que se da en el orden cero, sin embargo si observamos la similitud por colores se puede confirmar que la matriz funciona bien, ya que los objetos más similares o del mismo color están coordinados más cerca aunque no en forma de grupos definidos pero si poco distantes y el nivel de stress y de RSQ lo confirma como se observa en la **Tabla 7** porque indican que el ajuste de los datos es excelente.

Los diagramas de NMDS obtenidos con los datos de primera, segunda y tercera derivada (**Figura 7, 8, 9**) son bastante sencillos de interpretar ya que los objetos que

están coordinados más cerca unos de otros son probablemente más similares que los que están separados. Los valores de estrés para estas derivadas fueron altos generalmente por encima de 0,20 por lo que se infiere que la técnica es pobre en estos casos.

Los grupos acumulados de puntos que están muy separados de otros grupos pueden indicar algún tipo de relación ya sea por concentración de geranial, de α -pineno o incluso puede deberse al lugar de procedencia. Así mismo los datos de cuarta derivada mostraron un ajuste mínimo razonable que fue aceptable, sin embargo, la distribución espacial se observa mejor con los datos de 2D y 3D ya que cada citral se ubicó en un cuadrante diferente, facilitando la interpretación individual de las muestras.



NMDS filtrada – 2D

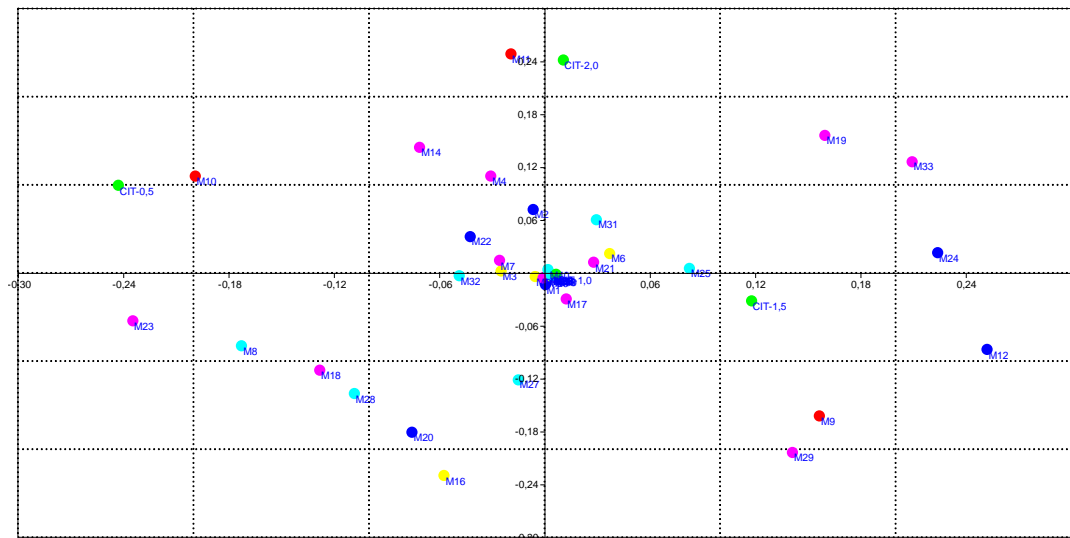


Figura 8. NMDS filtrada para 2D (segunda derivada)

Nota: NMDS - 2D utilizando distancia Manhattan.

Elaborado por: Los Autores, (2017)

NMDS filtrada – 3D

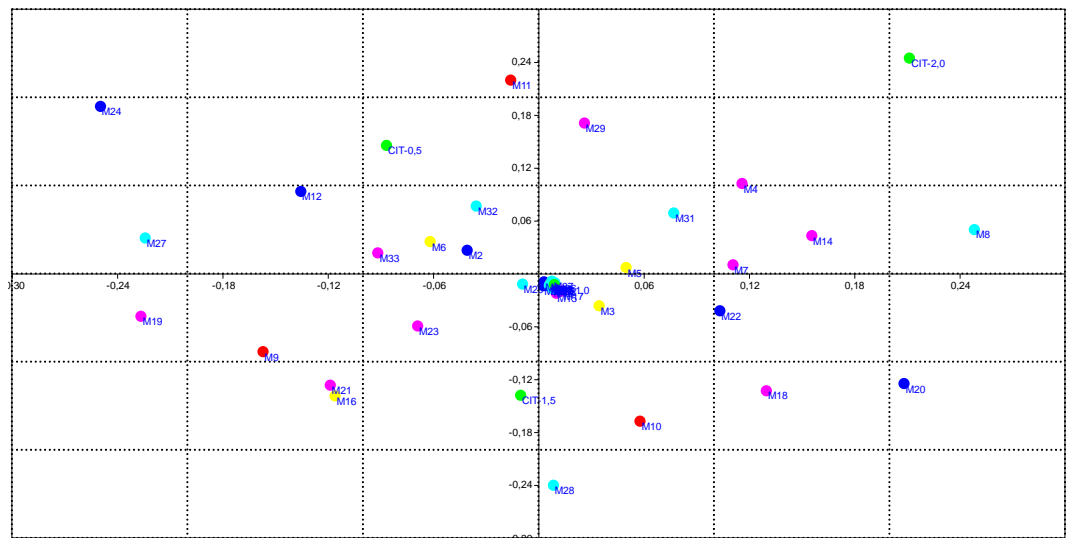
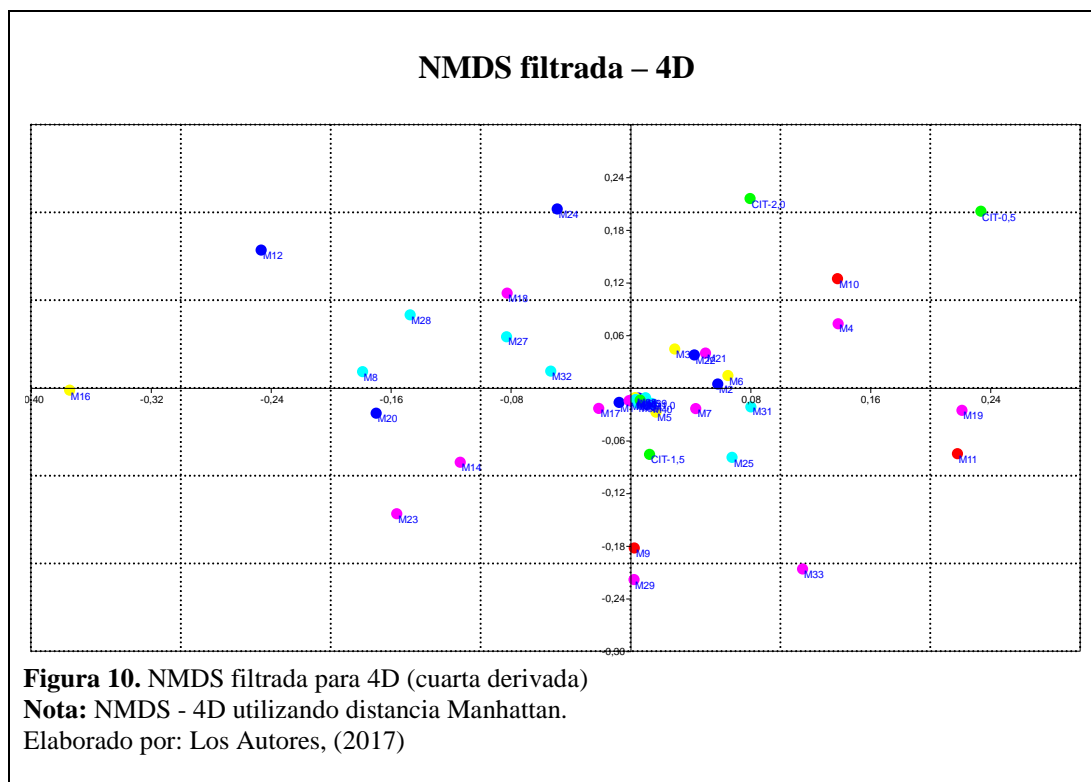


Figura 9. NMDS filtrada para 3D (tercera derivada)

Nota: NMDS - 3D utilizando distancia Manhattan.

Elaborado por: Los Autores, (2017)



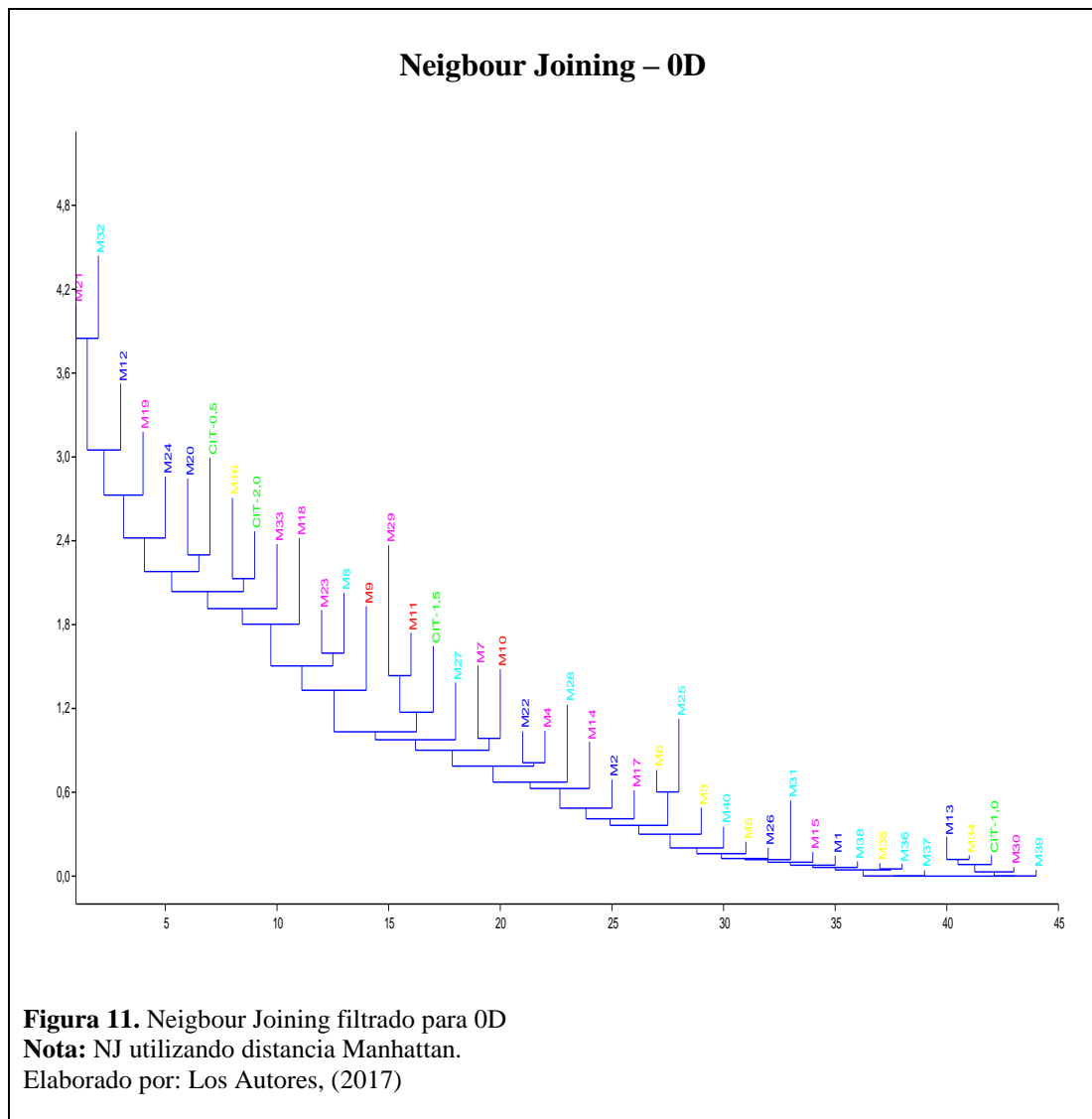
3.8 Interpretación de Neighbour Joining Clustering (NJ)

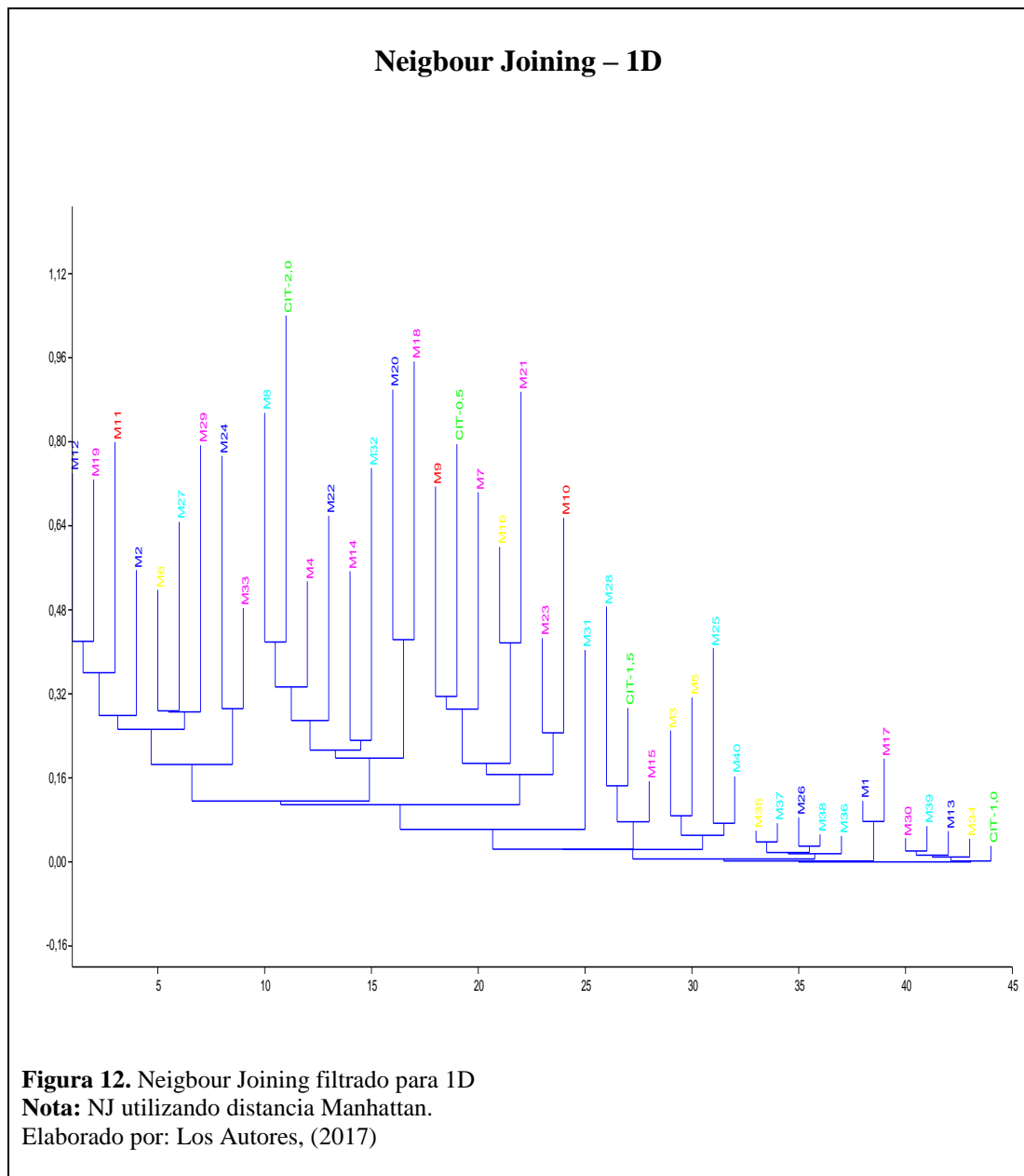
La matriz 0D bajo Neighbour Joining como se ve en la [Figura 11](#), evidenció dos agrupaciones contradictorias.

Por ejemplo, en el primer clado o grupo de izquierda a derecha se observó una agrupación entre muestras de nula cantidad de α -pineno M12, M24 y M20 con muestras de cantidad media M21 y M19, mismas que están agrupadas junto a los citrales 0,5 y 2,0 indicando que probablemente estas muestras son similares, pero por lógica la inferencia no es perceptiblemente adecuada.

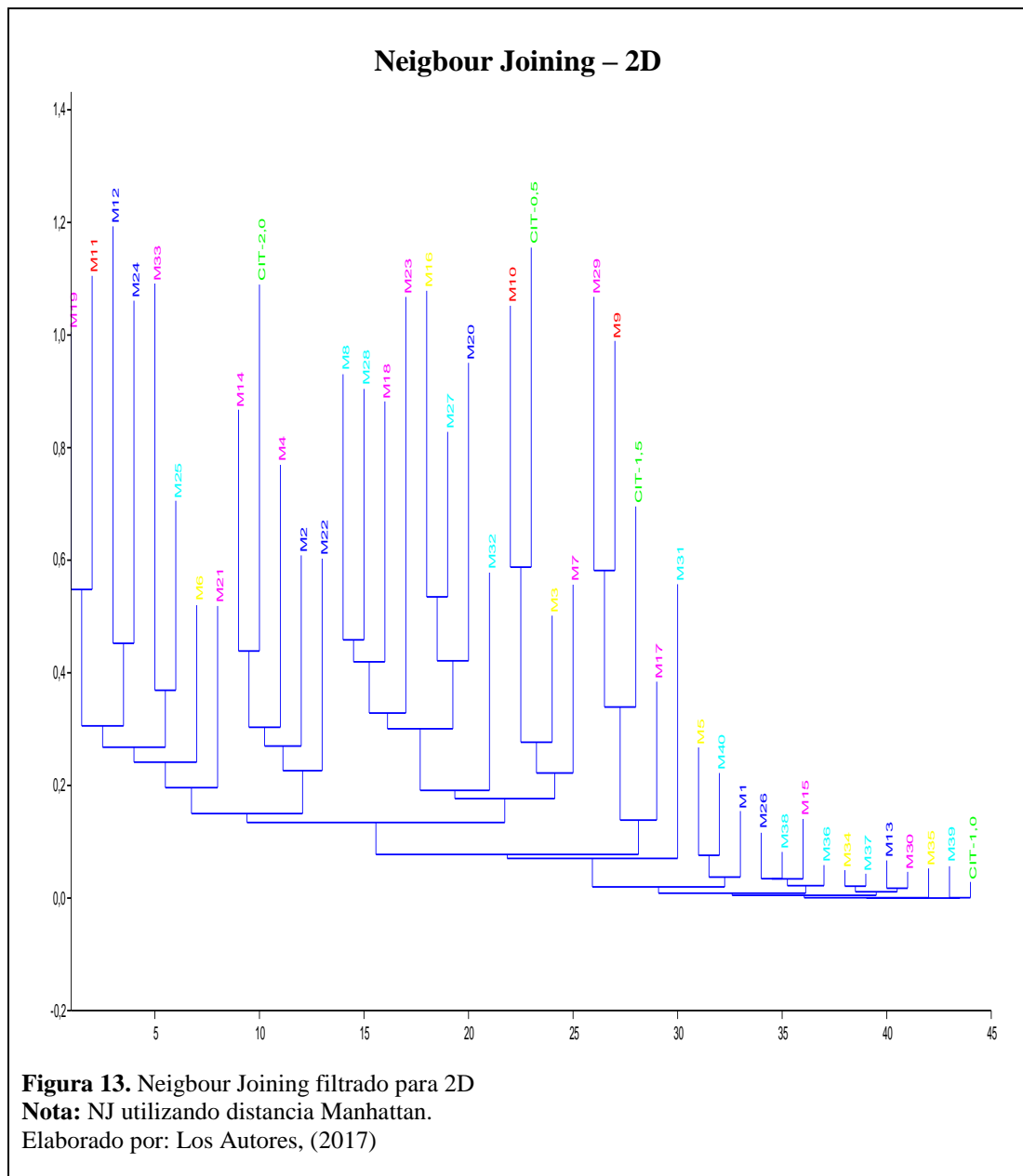
De la misma forma se observa que entre las distancias 20 y 25 del eje x se encuentra una agrupación que incluyen muestras de nulo α -pineno con medio, algo poco razonable, en estos casos se puede considerar eliminar ciertas muestras por ejemplo la

M21, M19, M22 y M2 que están interfiriendo en los resultados, pero aun así la agrupación cambiaría mostrando probablemente otras agrupaciones absurdas, sin embargo en este caso se resuelve que del 100% de agrupaciones el 9,09% está impidiendo una lectura aceptable.

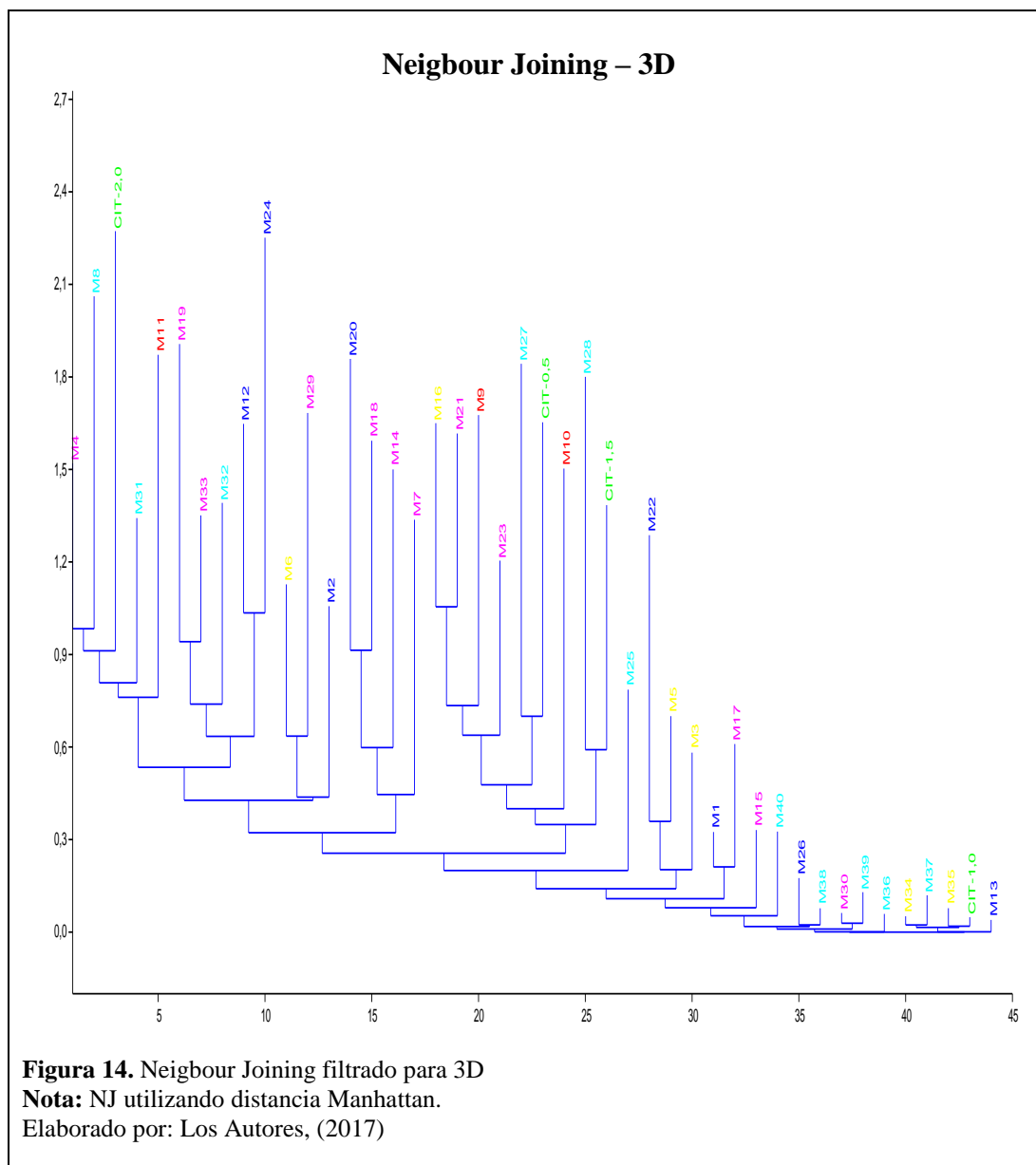




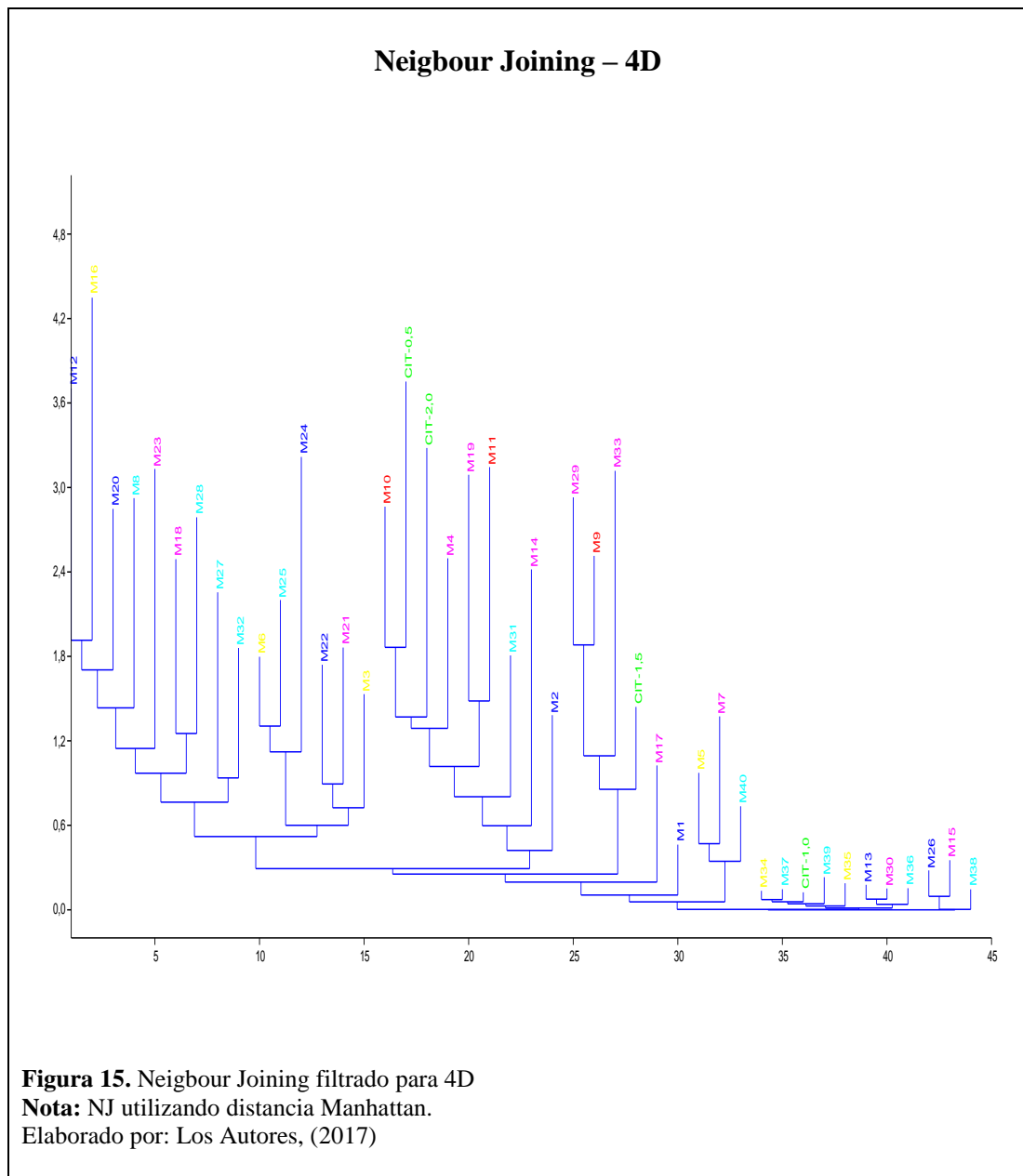
Al analizar la matriz 1D bajo Neighbour Joining como se ve en la **Figura 12**, se observó mayores distancias entre los estándares, por lo que la formación de grupos es más perceptible y evidente, pero no guarda semejanza con el análisis NMDS realizado bajo la misma matriz. De la misma forma el 15,90% del clúster perteneciente a las muestras M12, M2, M24, M22, M20, M17 y M30 está interfiriendo en la lectura.



El clúster Neighbour Joining para la matriz 2D señaló un mejor agrupamiento que 1D y por ende mucho mejor que 0D, como se ve en la **Figura 13**, colocando a los estándares de forma distante porque no deberían guardar relación ya que sus concentraciones son diferentes, además si se lo compara con el análisis NMDS se observa que existe una gran semejanza. Aquí también se tiene una inconsistencia del 9,09% perteneciente a las muestras M12, M24, M15 y M30.



Al analizar la matriz 3D bajo Neighbour Joining Clustering como se ve en la **Figura 14**, se observó que existe gran similitud en cuanto a al citral 0,5 y citral 1,5 debido a la poca distancia que existe entre ambos datos, por lo que la inferencia de la formación de grupos no es perceptiblemente adecuada. Sin embargo, la agrupación presentó una inconformidad sólo del 4,54% perteneciente a las muestras M29 y M30



La matriz 4D bajo Neighbour Joining Clustering que se observa en la [Figura 15](#), posee al igual que 0D una gran similitud en cuanto a al citral 0,5 y 2,0 debido a la poca distancia que existe entre ambos datos, haciendo que la inferencia de la formación de grupos no sea adecuada, ya que el método con está derivación no arroja los resultados esperados además el porcentaje de incertidumbre que pertenece a las muestras M21, M2, M1, M13 y M26 es de 11,36% mucho mayor que las anteriores derivadas.

Conclusiones

El análisis físico-químico determinó el buen estado de las muestras, a pesar de que su extracción se realizó hace un año presentaron excelentes características en cuanto a color, olor y apariencia, de igual manera el índice de refracción promedio de todas las muestras estuvo dentro de los límites para aceites esenciales corroborando la buena condición de las mismas.

Los descriptores más representativos utilizados en el análisis multivariado para clasificar las muestras por concentraciones terpénicas, fueron el resultado de una buena correlación entre las composiciones conocidas de citral y α -pineno obtenidas por GC-MS, con los datos respectivos a las longitudes de onda de la lectura espectrofotométrica después de su proceso de filtrado, determinando ambos métodos presentan las mismas tendencias, aunque sus valores difieran, demostrando que el método propuesto fue similar estadísticamente al método cromatográfico.

Después de analizar a las matrices con sus respectivas derivadas desde el orden 0 hasta el orden 4 bajo el análisis multivariado NMDS y Neighbour Joining, se observó que el uso de la derivación de segundo orden fue el más concluyente y acorde en comparación a la cromatografía de gases acoplada a masas, señalando un mejor agrupamiento dentro del esquema del Neighbour Joining y presentando las concentraciones de citral con mayores distanciamientos; a su vez, éste esquema guarda semejanza con el escalamiento multidimensional para la segunda derivada, demostrándose agrupamientos similares. También se observaron ciertos patrones con relación a la concentración de α -pineno en las muestras.

Se infiere que bajo la derivación en segundo grado fue posible la visualización e interpretación adecuada de los resultados, debido a la mejor resolución de los espectros en comparación al espectro original. De esta forma, se corrobora que el uso de técnicas multivariadas NMDS como complemento con Neighbour Joining permitieron desarrollar un modelo sobre la posible agrupación de muestras en función de su concentración de citral y de α -pineno proporcionando soluciones para nuevos posibles individuos. Así la espectrofotometría ultravioleta visible derivada, asociada a un análisis multivariante adecuado demuestra ser un método efectivo para la discriminación de datos, ya que es altamente específico, sensible, selectivo, rápido y requiere de una pequeña cantidad de muestra.

Recomendaciones

Calibrar el espectrofotómetro V-730 UV-visible después de correr tres o cuatro muestras, con el fin de obtener resultados óptimos, claros y veraces que estén de acuerdo con las especificaciones requeridas de hecho sus protocolos de funcionamiento recomiendan corregir la línea base después de ciertos períodos especificados por el usuario.

Realizar un buen manejo de las cubetas de cuarzo durante su limpieza para evitar rayones que comprometan el proceso de medición. Para cambiar de muestras en el instrumento analítico, es necesario limpiar con el mismo disolvente las celdas evitando posibles residuos de las muestras anteriores. Trabajar con preparaciones de muestras frescas, con esto se logra que no se pierdan datos en los análisis, debido a la naturaleza volátil del disolvente y del aceite.

Utilizar técnicas multivariantes robustas que engloban grandes cantidades de datos para obtener información muy variada con correlaciones válidas sin embargo, en casos como éste, se recomienda trabajar con una reducida cantidad de datos para que la percepción visual del analista en la interpretación final, no se vea comprometida.

Hacer uso de n-heptano como solvente del aceite esencial de hierba luisa para lecturas en el espectrofotómetro UV – Visible. De igual forma, utilizar los descriptores obtenidos bajo GC-MS para mayor absorción de longitud de onda.

Referencias

- Aguilera-Rodríguez, I. C.-H.-R.-S. (2016). Evaluación mediante espectrofotometría UV-VIS derivativa de la degradación del 2-clorofenol. *Revista Cubana de Química*, 25(3), 318-327.
- Albarracín, G., & Gallo, S. (2003). Comparación de dos métodos de extracción de aceite esencial utilizando Piper aduncum (cordoncillo) procedente de la zona cafetera. *Universidad Nacional de Colombia de Manizales Ingeniería Química*.
- Altamirano, F., & Vásquez, K. (2016). *Variación de la composición química de los aceites esenciales de cúrcuma (Curcuma longa), hierba luisa (Cymbopogon citratus) y jengibre (Zingiber officinale) en función del tipo de suelo de la zona de cultivo de las especies vegetales en las provincias de*. Tesis, Universidad Politécnica Salesiana, Quito-Ecuador.
- Alzate, D. A., Mier, G. I., Alfador, L., Durango, D. L., & García, C. M. (18 de Nov. de 2009). Evaluación de la fitotoxicidad y la actividad antifúngica contra Colletotrichum acutatum de los aceites esenciales de tomillo (Thymus vulgaris), limoncillo (Cymbopogon citratus), y sus componentes mayoritarios. *VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 16(1), 116-125. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169815393013>.
- Amézquita López, F., & Mendoza Olivares, D. (2008). *Taller básico de Espectroscopia UV-VIS*. Universidad de Guanajuato, Facultad de Química, Guanajuato.
- Angulo Flórez, A. M., Cardona, E., Lozano Calderón, A. T., Montañez Pinzón, K. A., & Salcedo Osorio, A. F. (2014). Introducción a la industria de los aceites

esenciales extraídos de plantas medicinales y aromáticas. *Aceites esenciales extraídos de las plantas medicinales y aromáticas, 1.*

Antolínez González, J. C., G. de Colmenares, N., Usubillaga, A., Darghan, E., & Linares, S. (sep. de 2008). Evaluación de variables agronómicas en el cultivo de limonaria (*Cymbopogon Citratus Stapf*) para la producción de aceite esencial. *Interciencia versión impresa ISSN 0378-1844*, 33(9), 693-700.

Bandoni, A. (2000). Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. *Argentina. Editorial Universidad Nacional de la Plata.*

Barbosa, L. C., Pereira, U. A., Martinazzo, A. P., Maltha, C. R., Teixeira, R. R., & Melo, E. d. (2008). Evaluation of the Chemical Composition of Brazilian Commercial *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf Samples. *Molecules*, 13(8), 1864-1874. <https://doi:10.3390/molecules13081864>.

Brunatti, C., & Martín, A. (2010). *Introducción a la Espectroscopía de Absorción Molecular Ultravioleta, Visible e Infrarrojo Cercano*. Recuperado el 26 de 02 de 2017, de <http://materias.fi.uba.ar/6305/download/Espectrofotometria.pdf>

Calle, S., Chasiluisa, S., Carajal, J., & Herrera, R. (2015). Procesamiento de datos de espectrometría de masas: Algoritmos y metodologías. *MASKANA*, 204-205.

Carey, F. A., & Giuliano, R. M. (2014). Química orgánica. México: McGraw-Hill/Interamericana Editores, S.A. de C.V.

Cifuentes Mendez, C. M. (2013). *Estudio de la composición química del tónico amargo de la corteza de quina roja (Cinchona pubescens).*

Closas, A., Arriola, E., Zening, K., Isabel, C., Amarilla, M., & Jovanovich, E. (2013). Análisis multivariante, conceptos y aplicaciones en Psicología Educativa y Psicometría. *Enfoques*, 25(1), 65-92.

- Cuadras, C. (2007). *Nuevos métodos de análisis multivariante*. Barcelona, Spain: CMC Editions.
- De la Mata E., P. (2011). Aplicabilidad de la cromatografía líquida y espectrometría vibracional para desarrollar modelos multivariantes para la detección y cuantificación de aceite de oliva en mezclas de aceites vegetales. *Tesis Doctoral*. Granada: Editorial de la Universidad de Granada.
- De León Solís, C. A. (2004). *Implementación de un método para determinar la calidad del aceite esencial de limón (Citrus aurantifolia) por cromatografía en capa fina y espectroscopía ultravioleta como método alternativo a la cromatografía de gases*. Universidad de San Carlos de Guatemala, Departamento de Química, Guatemala.
- Del Pozo Espinosa, X. A. (2006). *Extracción, caracterización y determinación de la actividad antibacteriana y antimicótica del aceite esencial de Hierba Luisa (Cymbopogon Citratus (DC) stapf)*. Tesis, Escuela Politécnica del Ejército, Facultad de Ciencias Aplicadas, Sangolquí, Pichincha, Ecuador.
- Demey, J. R., Pla, L., Vicente-Villardón, J. L., Rienzo, J. A., & Casanoves, F. (2017). *Medidas de distancia y de similitud*.
- Díaz, V. (26 de mayo de 2011). *Espectroscopia UV-Visible*. Obtenido de https://es.slideshare.net/daecko/rayos-ultravioleta?from_action=save
- Escalona Cruz, L. J. (2015). Uso tradicional de plantas medicinales por el adulto mayor en la comunidad serrana de Corralillo Arriba. Guisa, Granma. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 20(4), 95.
- Esponda, D., Cabrera, I., Nualles, M., & Fernández, L. (2010). Utilización del análisis de cluster con variables mixtas en la selección de genotipos de maíz (*Zea mays*). *Investigación Operacional*, 31(3), 209-217.

- Estévez Báez, M., Machado García, A., & Estévez Carrera, J. M. (2008). *Análisis de correlación y suavizado de espectrogramas*. CST. librosabiertos.
- Fernández, R. (2006). Técnicas estadísticas multivariadas y sus aplicaciones a indicadores e índices económicos financieros de la actividad turística. *Matemáticas Financieras y Evaluación de Proyectos.*, 13(7).
- Flores, M., & Patiño, B. (2016). *Variación de la composición química de los aceites esenciales de hierba luisa (Cymbopogon citratus) y jengibre (Zingiber officinale) en función de las condiciones ambientales y del tipo de suelo de la zona de cultivo en las provincias de Esmeraldas, Manab*. Tesis, Universidad Politécnica Salesiana, Quito-Ecuador.
- Friedman, J., Hastie, T., & Tibshirani, R. (2009). *The elements of statistical learning*.
Obtenido de Doi: 10.1007/b94608
- Fundación Chankuap. (2009). *Ficha Técnica del aceite esencial Hierba Luisa*. Área de Transformación de productos. Macas, Ecuador: EC140150.
- Gamboa, N. (1991). El empleo de la derivada en la espectroscopía ultra violeta-visible. *Revista de Química.*, 5(2), 179-195.
- García, R. (2015). *Obtención de aceite esencial de citronela (Cymbopogon winterianus) extraído por arrastre con vapor a escala piloto: estudio de la influencia de variables en el rendimiento y la calidad del aceite*.
- García, S. (junio de 2010). Caracterización fisicoquímica de aceite esencial de limón de Tucumán. *Cuartas Jornadas de Jóvenes Investigadores UNT - CONICET*. Tucumán: Universidad Nacional de Tucumán.
- Gbenou, J. D., Ahounou, J. F., Akakpo, H. B., Laleye, A., Yayi, E., Gbaguidi, F., . . . Baba-Moussa, L. (Feb de 2013). Phytochemical composition of *Cymbopogon citratus* and *Eucalyptus citriodora* essential oils and their anti-inflammatory

- and analgesic properties on Wistar rats. *Molecular biology reports*, 40(2), 1127–1134. [https://doi: 10.1007/s11033-012-2155-1](https://doi.org/10.1007/s11033-012-2155-1).
- Guerra Ordóñez, M., Rodríguez Jorge, M., García Simón, G., & Llerena Rangel, C. (2004). Actividad antimicrobiana del aceite esencial y crema de *Cymbopogon citratus* (DC). Stapf. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 9(2).
- Guerrero, F., & Ramírez, J. (2012). El análisis de escalamiento multidimensional: una alternativa y un complemento a otras técnicas multivariantes. *Revista La sociología en sus escenarios*, 25.
- Hammer, O., Harper, D., & Ryan, P. (2013). PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *PAST version 2.17c*, 4(1), 9.
- Hanneman, R. (2001). *Introducción a los métodos del análisis de redes sociales*. Obtenido de Universidad de California Riverside: <http://revista-redes.rediris.es/webredes/textos/cap9.pdf>
- Hernández, L., & González, C. (2002). Capítulo 3: Espectrofotometría de absorción ultravioleta-visible. En *Introducción al análisis instrumental* (1a edición ed., pág. 45). Barcelona: Ariel, S. A.
- Instituto de Investigación de Recursos Biológicos “Alexander Von Humboldt”. (2003). Estudio del mercado Colombiano de aceites esenciales. Bogotá – Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos.
- JASCO. (2013). *Spectra Analysis Software Manual*. Tokyo: JASCO Corporation.
- Laboratorio de Química Orgánica Aplicada. (2010). *Academia*. (G. G. Apaza Sánchez, Ed.) Recuperado el 21 de 06 de 2017, de Guía No 2: Ensayos preliminares y clasificación de compuestos: http://www.academia.edu/7663465/LABORATORIO_DE_QU%C3%8DMICA_ORGANICA_502502_GU%C3%8DA_No_2_ENSAYOS_PRELIMINAR

ES_Y_CLASIFICACI%C3%93N_DE_COMPUESTOS_POR_SUBILIDAD
_I_EL_PROBLEMA

- Lago, S., & María, H. (1995). Aplicaciones de la espectrofotometría derivada a la determinación de metales con el ácido metiletilendiaminotetraacético. *AMEDT*.
- Leal, E. (2013). Caracterización de los Aceites Esenciales. *Temas Selectos de Ingeniería en Alimentos*, 97-103.
- Levine, I. N. (2004). Capítulo 21: Espectroscopia y Fotoquímica. En *Fisicoquímica* (Vol. 2, págs. 912-915). Concepción Fernández Madrid.
- Lima, R., das Graças Cardoso, M., Moraes, J., Vieira, S., Melo, B., & Filgueiras, C. (2008). Composition of the Essential Oils from the Japanese Star Anise *Illicium verum* L. and Lemon Grass. *BioAssay*, 3(8), 1-6.
<http://dx.doi.org/10.14295/BA.v3.0.56>.
- Linares, S., González, N., Gómez, E., Usubillaga, A., & Darghan, E. (2005). Efecto de la fertilización, densidad de siembra y tiempo de corte sobre el rendimiento y calidad del aceite esencial extraído de *Cymbopogon citratus* Stapf. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 22(3), 250-263.
- Loachamín, L., & Loayza, C. (2016). Variación de la composición química de los aceites esenciales de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) y jengibre (*Zingiber officinale*) en función de las condiciones ambientales y del tipo de suelo de la zona cultivo en las provincias de Loja, Azuay, Cañar,. Quito, Ecuador: Universidad Politécnica Salesiana.
- López de Alba, P. L., & López Martíne, L. (1993). *Una introducción a la espectrometría de derivadas*. Instituto de Investigadones Científicas de la Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Gto., 36000 México.

- Martelo Vidal, M. (2014). DESARROLLO DE MÉTODOS RÁPIDOS BASADOS EN ESPECTROSCOPIA UV-VIS-NIR PARA EL ANÁLISIS DE VINOS. *DEPARTAMENTO DE QUÍMICA, ANALÍTICA, NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA*, 82.
- Mendoza Meza, D. L., & Taborda, M. (2010). Composición química y actividad acaricida del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* Stapf contra el acaro intradomiciliario *Dermatophagoides farinae* (Acari: pyroglyphidae). *Biosalud*, 9(2), 21-31.
- Mérida Reyes, S. (2012). *Estudio del rendimiento y composición del aceite esencial de diferentes poblaciones silvestres de Lippia chiapasensis Loes. del altiplano occidental guatemalteco*. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Meza, K., & Vargas, G. (2013). Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf), poaceae en una formulación cosmética con finalidad antiacnéica. Quito, Pichincha, Ecuador: Universidad Politécnica Salesiana.
- Moreno, A. (2007). 100 Problemas Resueltos de Estadística Multivariante Implementados en Matlab. *Delta Publicaciones*.
- Murillo, E., & Méndez, J. (2007). *Guía metodológica para la detección rápida de algunos núcleos secundarios y caracterización de una droga cruda*. Universidad del Tolima, Departamento de química. Facultad de ciencias. Ibagué: Departamento de química. Facultad de ciencias. Universidad del Tolima.

- Negrelle, R., & Gomes, E. (2007). *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf : chemical composition and biological activities. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*, 9(1), 80-92.
- NTE INEN-ISO 6320. (20113). ACEITES Y GRASAS DE ORIGEN ANIMAL Y VEGETAL. DETERMINACIÓN DEL INDICE DE REFRACCION. *Norma Técnica Ecuatoriana Voluntaria*, (pág. 1). Quito, Ecuador.
- Núñez, C. E. (2008). *Comentarios sobre solventes y solubilidades de sustancias orgánicas*. Solventes y solubilidades.
- Olivares, A. (2007). Sistemática molecular del género *Fissurella* en el Pacífico Sudoriental. Universidad Santiago de Compostela.
- Olsen, E. (1990). Métodos ópticos de análisis. *Reverte*.
- Patel, K. N. (2010). Derivative spectrometry method for chemical analysis: A review. *Der Pharmacia Lettre*, 2(2), 139-150.
- Peña, C. (agosto de 2011). Métodos de inferencia filogenética. (Laboratory of Genetics, Ed.) *Rev. peru. biol*, 18(2), 265 - 267.
- QUIORED. (agosto de 2002). *Recursos Educativos de Química Orgánica*. Obtenido de Reglas de Woodward para compuestos carbonílicos conjugados: http://www.ugr.es/~quiorred/lab/tablas_espec/uv.htm
- Quirantes, R., Domínguez, J., Segura, A., & Fernández, A. (2016). *Capítulo 9: Técnicas de análisis del aceite de oliva*. España.
- Reyes Aguilar, P. (2010). *Mínimos Cuadrados Parciales (PLS)*. Lean Sigma.
- Ríos, Á., Moreno, M. C., & Simonet, B. M. (2012). Espectroscopia de absorción molecular UV-visible. En *Técnicas espectroscópicas en química analítica. Volumen I. Aspectos básicos y espectrometría molecular* (págs. 225-230). Síntesis, S. A.

Rodríguez Tello, E. A. (23 de julio de 2013). *Construcción de árboles filogenéticos*.

Obtenido de CINVESTAV-Tamaulipas:

<http://www.tamps.cinvestav.mx/~ertello/bioinfo/sesion13.pdf>

Rodríguez, A. (2001). Determinación de cafeína en bebidas gasificadas oscuras y determinación de caseína en leche. Aplicación de la Espectrofotometría de Segunda Derivada. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, 4(2), 72-77.

Rodríguez, H. L., Giraldo, P. G., & Murillo, P. E. (2011). Determinación del quimiotipo de la fracción volátil del aceite esencial de hojas de albahaca de variedad ocimum, por cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS). *Revista Tumbaga*, 1(6), 53-62.

Salazar, M. (2000). Coeficientes de Asociación. *Plaza y Valdes*.

Saldaña Medina, J. R., & Torres Vintimilla, M. V. (2012). *Efecto analgésico de aceites esenciales de Hierba Luisa (Cymbopogon citratus), Ruda (Ruta graveolens), formulados como conos nasales*. Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Químicas, Cuenca-Ecuador.

Salvador Figueras, M. (2000). *Introducción al Análisis Multivariante*. Recuperado el

25 de 07 de 2017, de Estadística:

<http://ciberconta.unizar.es/leccion/anamul/INICIO.HTML>

Shah, G., Shri, R., Panchal, V., Sharma, N., Singh, B., & Mann, A. (2011). Scientific basis for the therapeutic use of Cymbopogon citratus, stapf (Lemon grass). *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 2(1), 3–8. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.79796>.

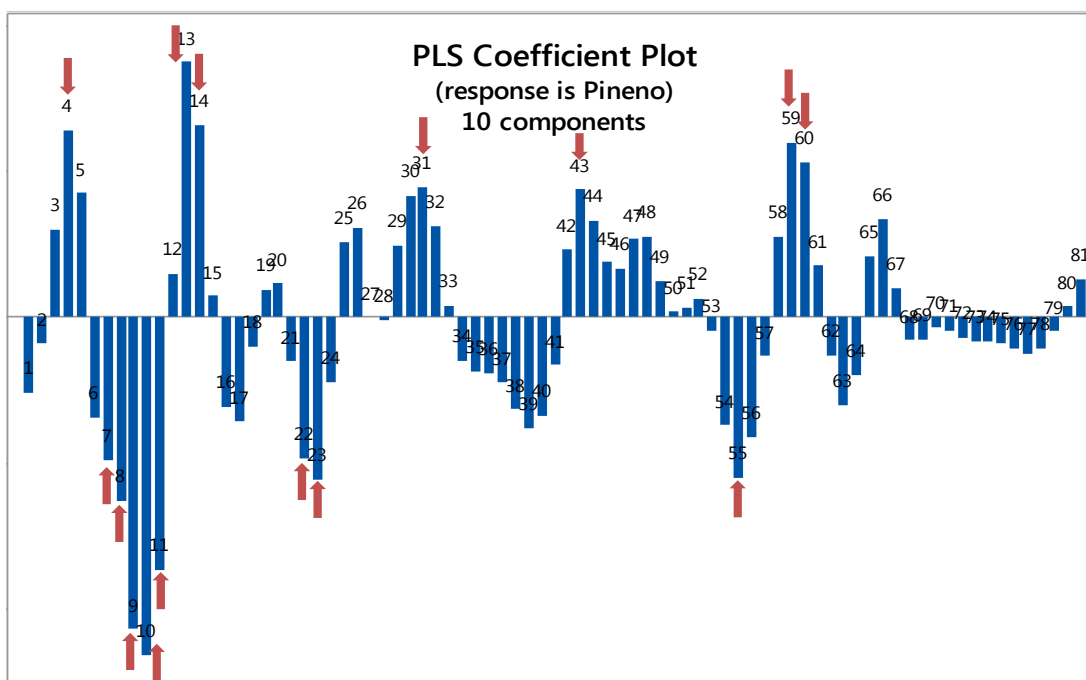
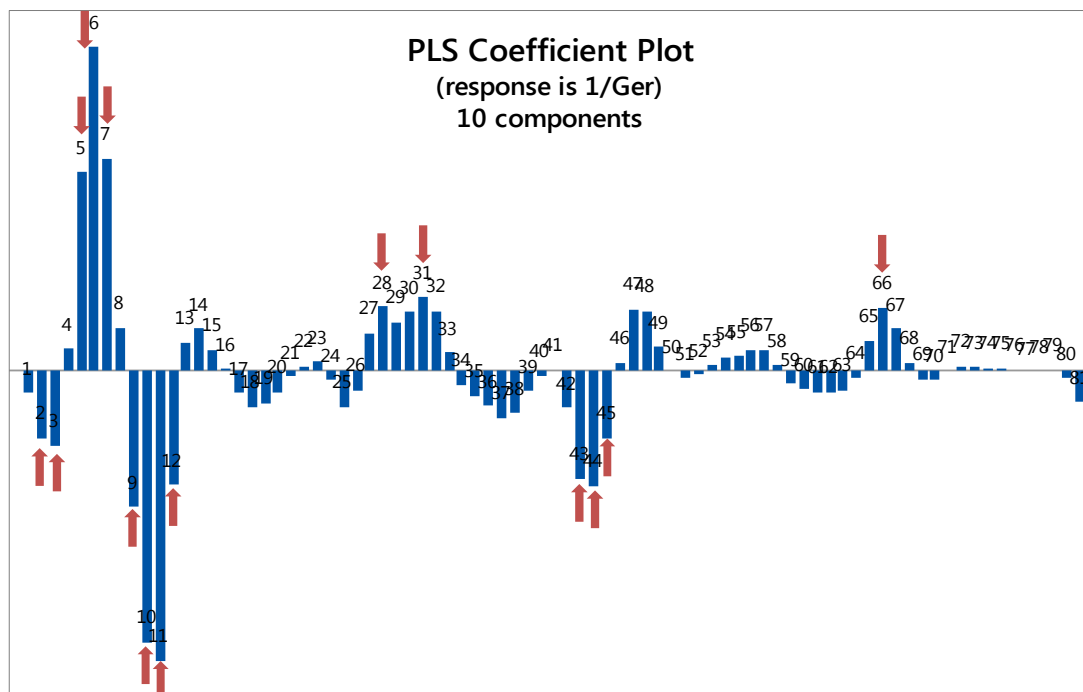
- Soto, R., Vega, G., & Tamajón, A. (2002). Instructivo técnico del cultivo de *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf (caña santa). *Revista cubana de Plantas Medicinales*, 7(2).
- Stashenko, E., Ruiz, C., Tunarosa, F., & Martínez, J. (2007). ESTUDIO COMPARATIVO POR GC-MS DE METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE DOS QUIMIOTIPOS DE *Lippia origanoides* H.B.K., OBTENIDOS POR DIFERENTES TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN. *Scientia et Technica*, 325-326.
- Tamajón Navarro, A. L., Soto Ortiz, R., & Vega Marre, G. (2002). Instructivo técnico del cultivo de *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf (caña santa). *Revista Cubana de Plantas Medicinales (online)*, 7(2), versión On-line ISSN 1028-4796.
- Thangabalan, B. (2012). *Derivative spectroscopy*. Obtenido de <http://www.authorstream.com/Presentation/koyi007-1308509-derivative-spectroscopy/>
- Tisserand, M. (2014). Aromatherapy vs MRSA: Antimicrobial essential oils to combat bacterial infection, including the superbug. *Singing Dragon*.
- Toral, M. I., Orellana, S., Saldías, M., & Soto, C. (2009). Estrategias en el desarrollo de métodos analíticos para la determinación simultánea de compuestos orgánicos por espectrofotometría derivada. *Química Nova*, 32(1), 257-262. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000100043>.
- Toral, M., Lara, N., Gomez, J., & Richter, P. (2001). Determinación de hierro en fase sólida por espectrofotometría derivada de segundo orden. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, 46(1), 51-60. doi:<https://doi.org/10.4067/S0366-16442001000100009>

Valdéz Blanco, D. (2010). Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales. *Revista Varianza*, 18.

Worwood, S., & Worwood, V. (2012). *Essential Aromatherapy: A Pocket Guide to Essential Oils and Aromatherapy*. New World Library.

Anexos

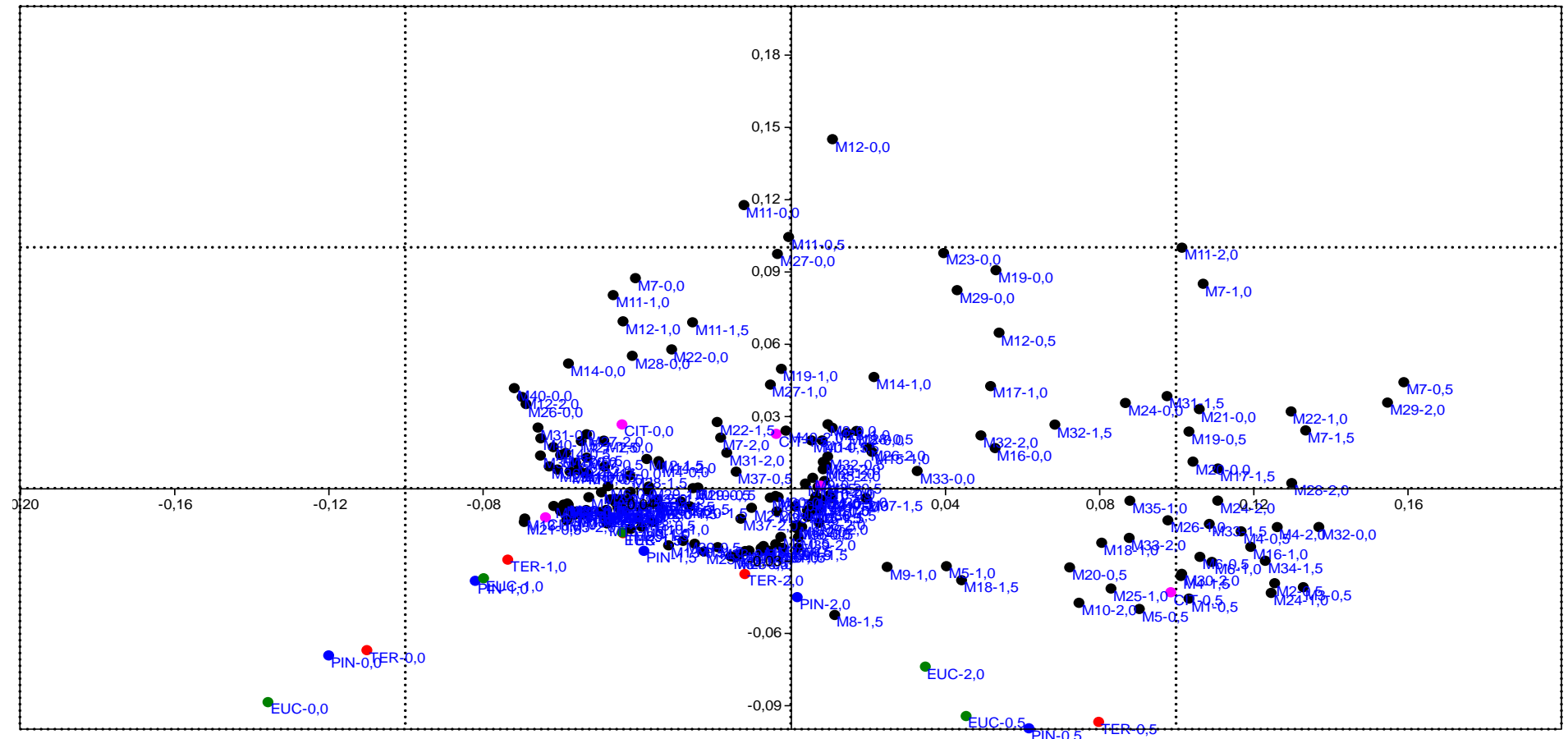
Anexo 1. Gráfica de coeficientes estandarizados para los predictores de geranial y α -pineno.



Nota: Cada número en la gráfica corresponde a una longitud de onda, por ejemplo el N°1 representa a la $\lambda = 270$ y el N°81 a la $\lambda = 190$. Las flechas corresponden a los predictores de mayor magnitud seleccionados.

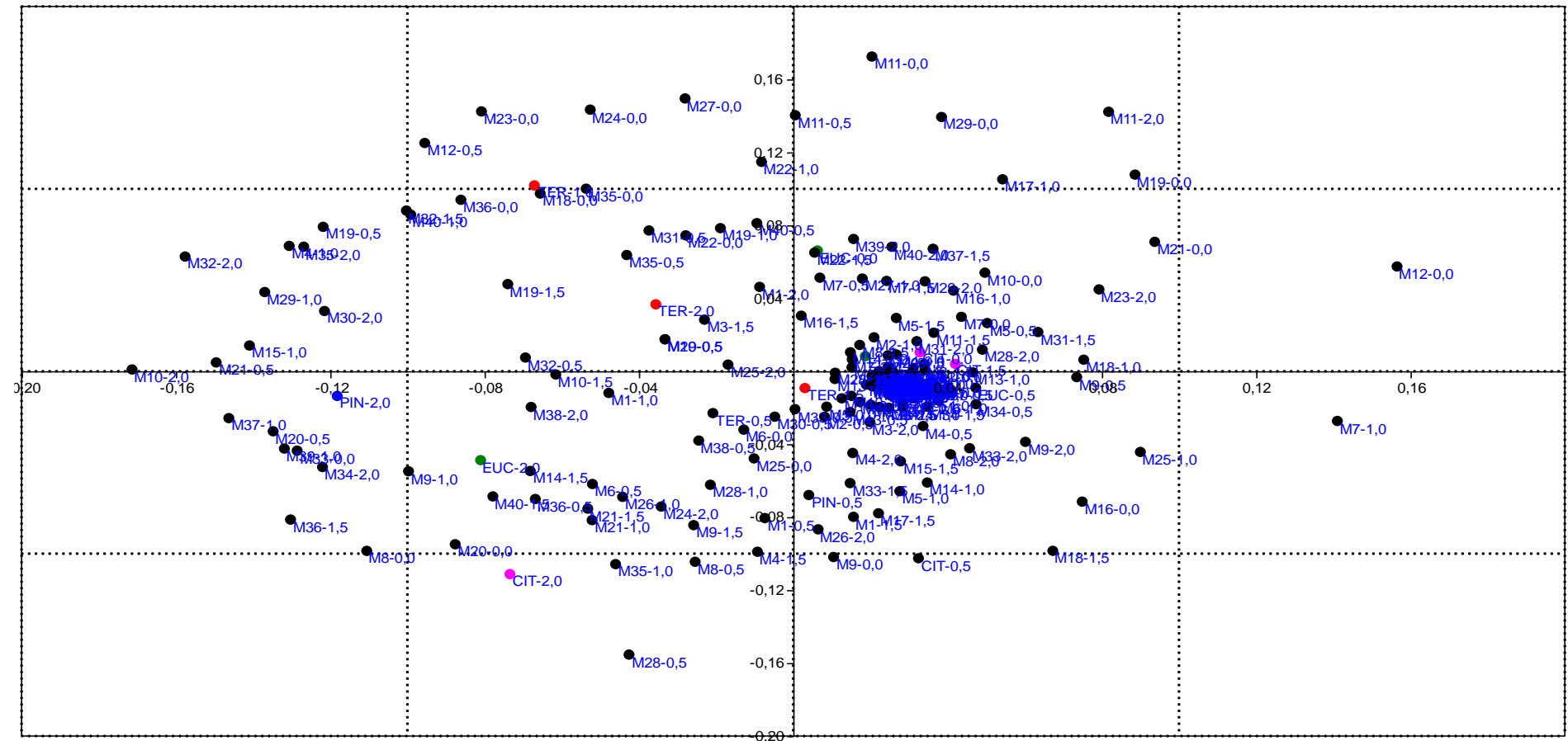
Elaborado por: Los Autores, (2017)

Anexo 2. NMDS Completa - 0D



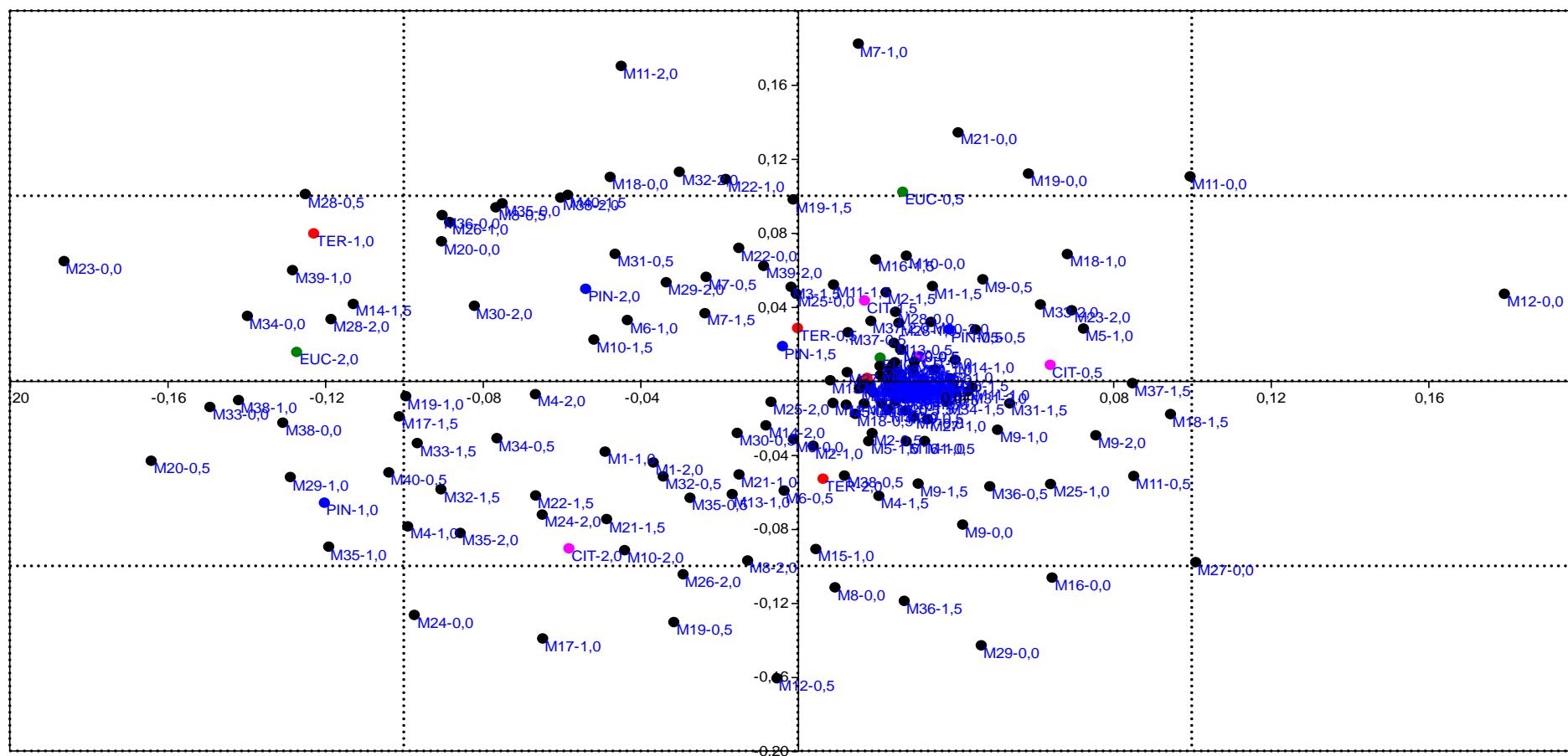
Nota: Gráfica NMDS - 0D con un valor de stress = 0,1861 y RSQ = 0,7474 con modelo de distancia Manhattan. Elaborado por: Los Autores, (2017)

Anexo 3. NMDS Completa - 1D



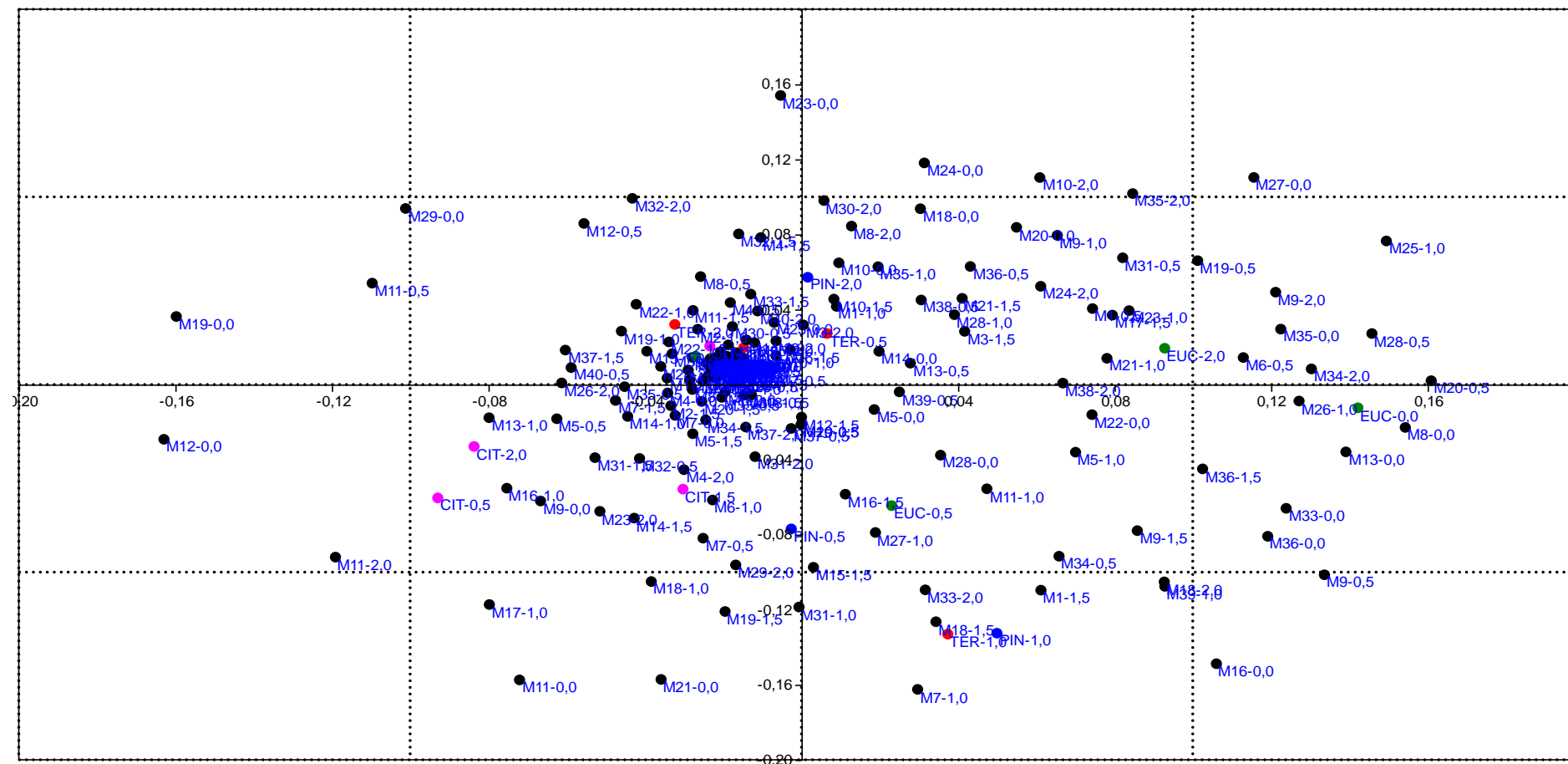
Nota: Gráfica NMDS - 1D con un valor de stress = 0,4589 y RSQ = 0,2696 con modelo de distancia Manhattan.
Elaborado por: Los Autores, (2017)

Anexo 4. NMDS Completa - 2D



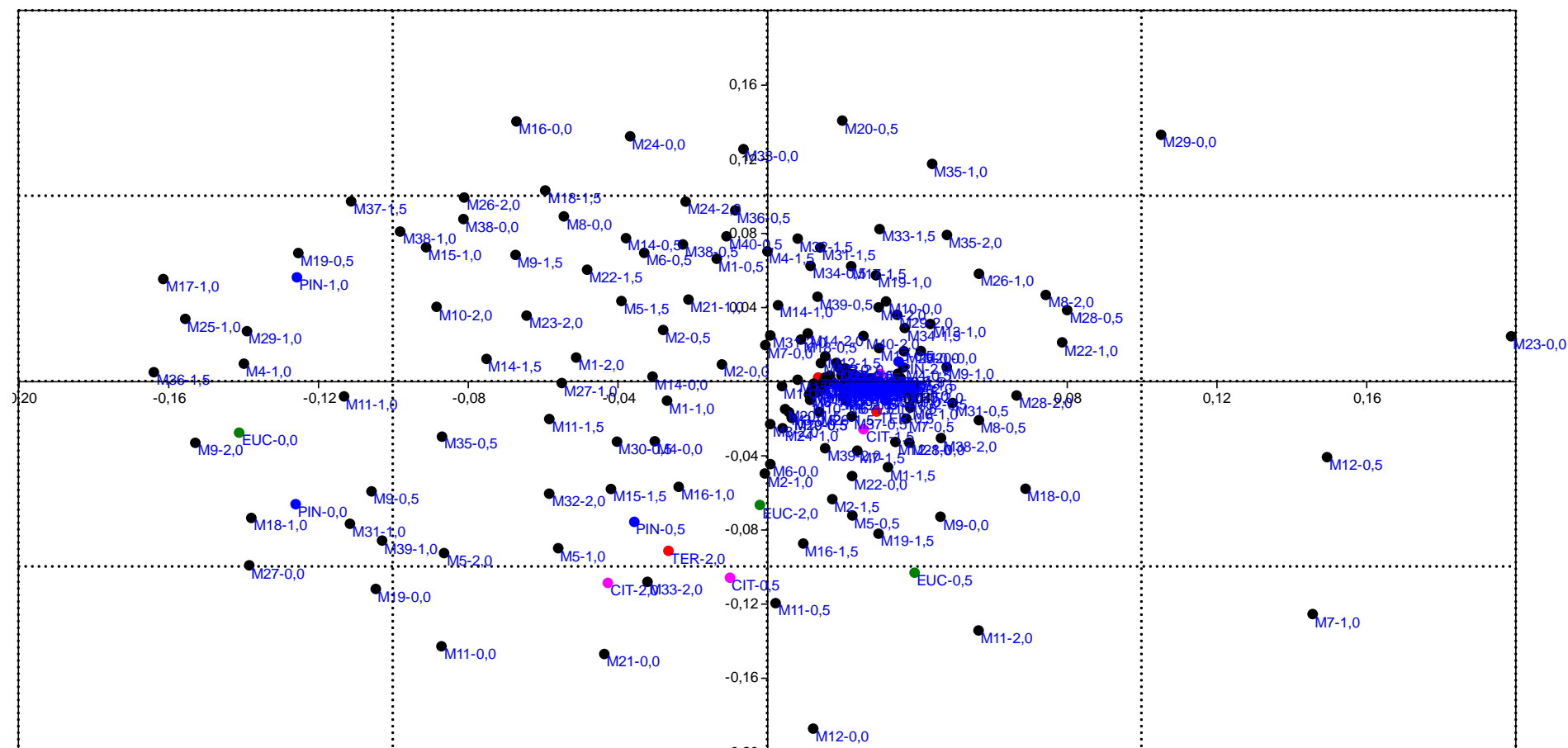
Nota: Gráfica NMDS - 2D con un valor de stress = 0,4510 y RSQ = 0,2810 con modelo de distancia Manhattan. Elaborado por: Los Autores, (2017)

Anexo 5. NMDS Completa - 3D



Nota: Gráfica NMDS - 3D con un valor de stress = 0,4466 y RSQ = 0,2174 con modelo de distancia Manhattan.
Elaborado por: Los Autores, (2017)

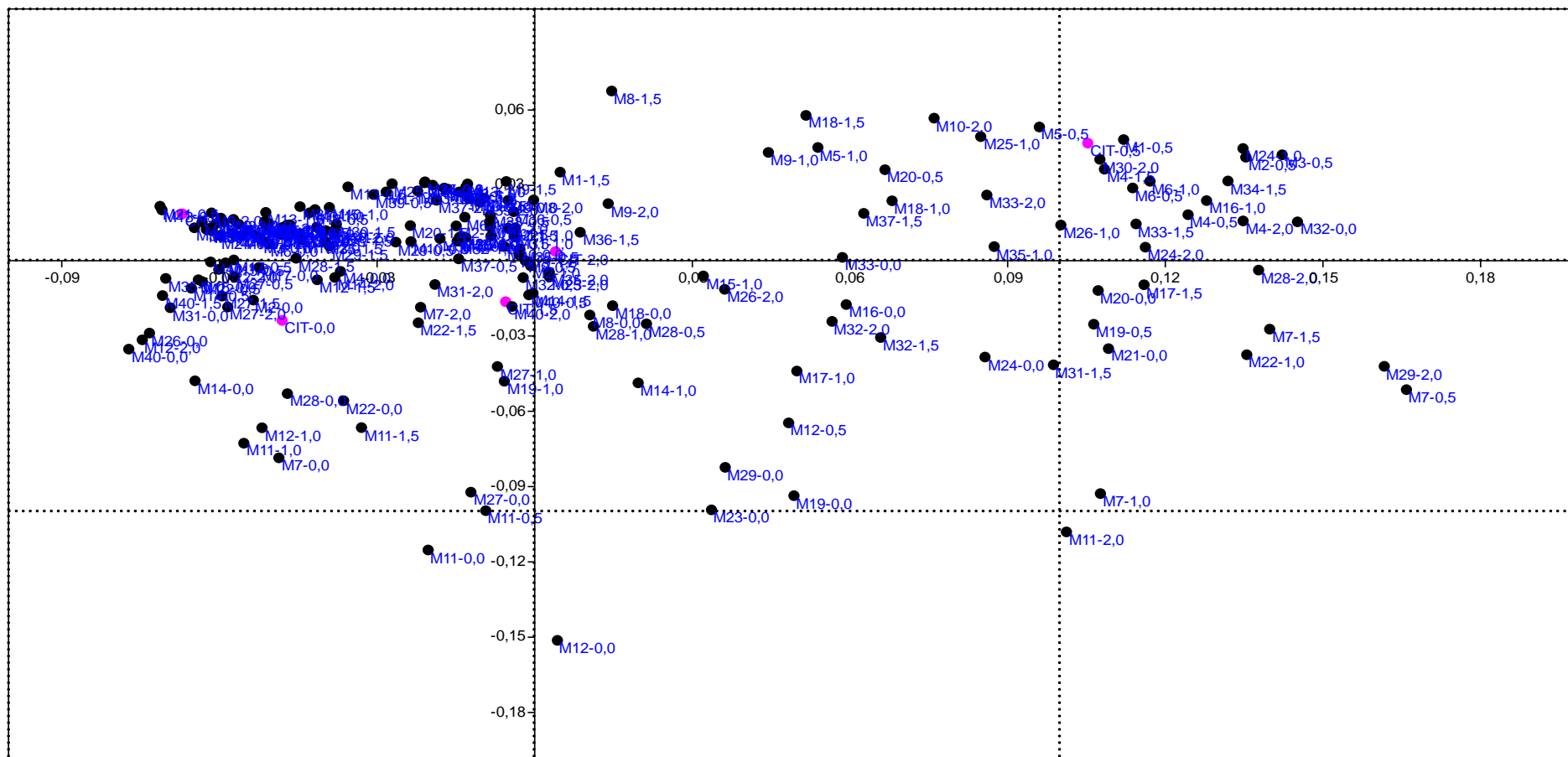
Anexo 6. NMDS Completa - 4D



Nota: Gráfica NMDS - 4D con un valor de stress = 0,4369 y RSQ = 0,3041 con modelo de distancia Manhattan.

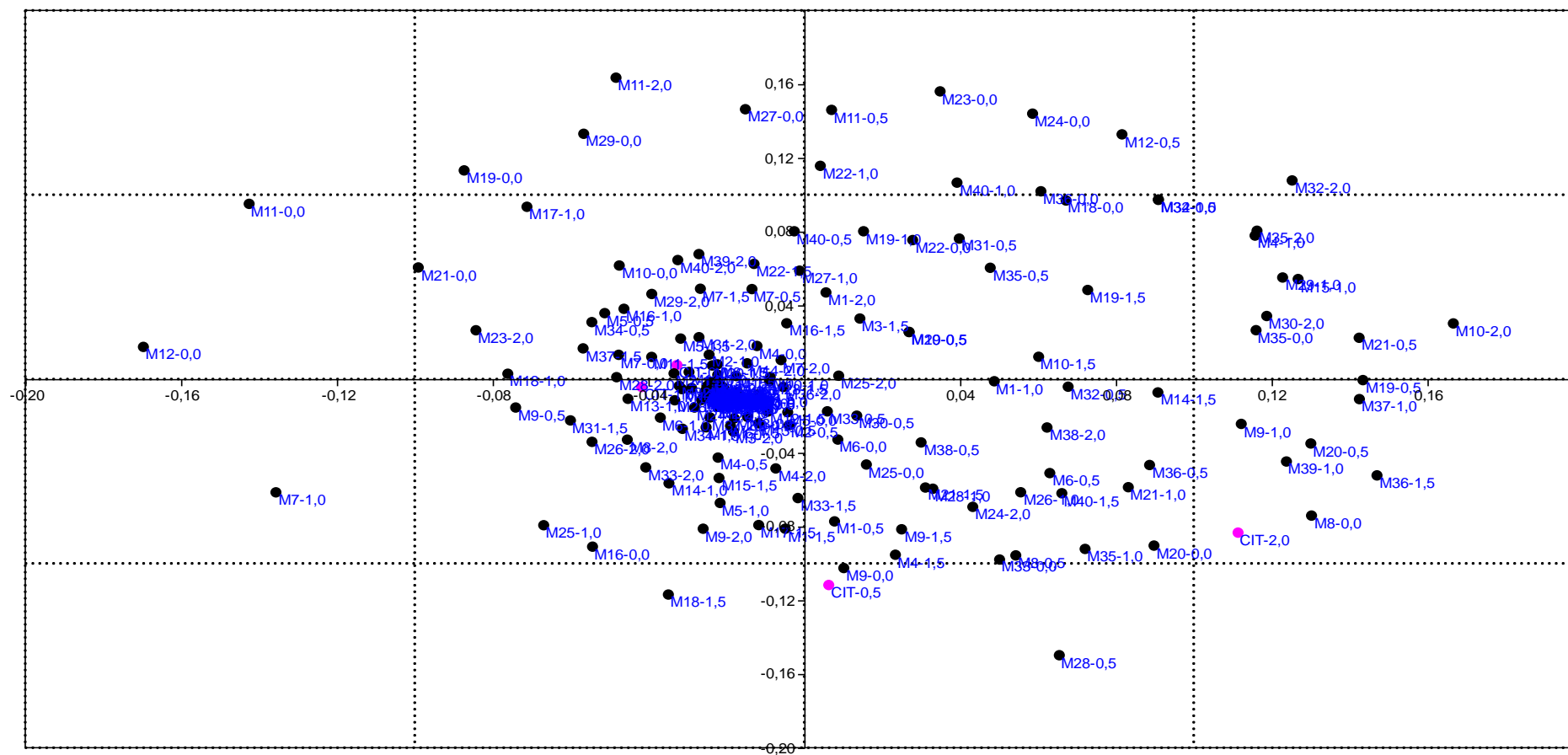
Elaborado por: Los Autores, (2017)

Anexo 7. NMDS Parcial - 0D



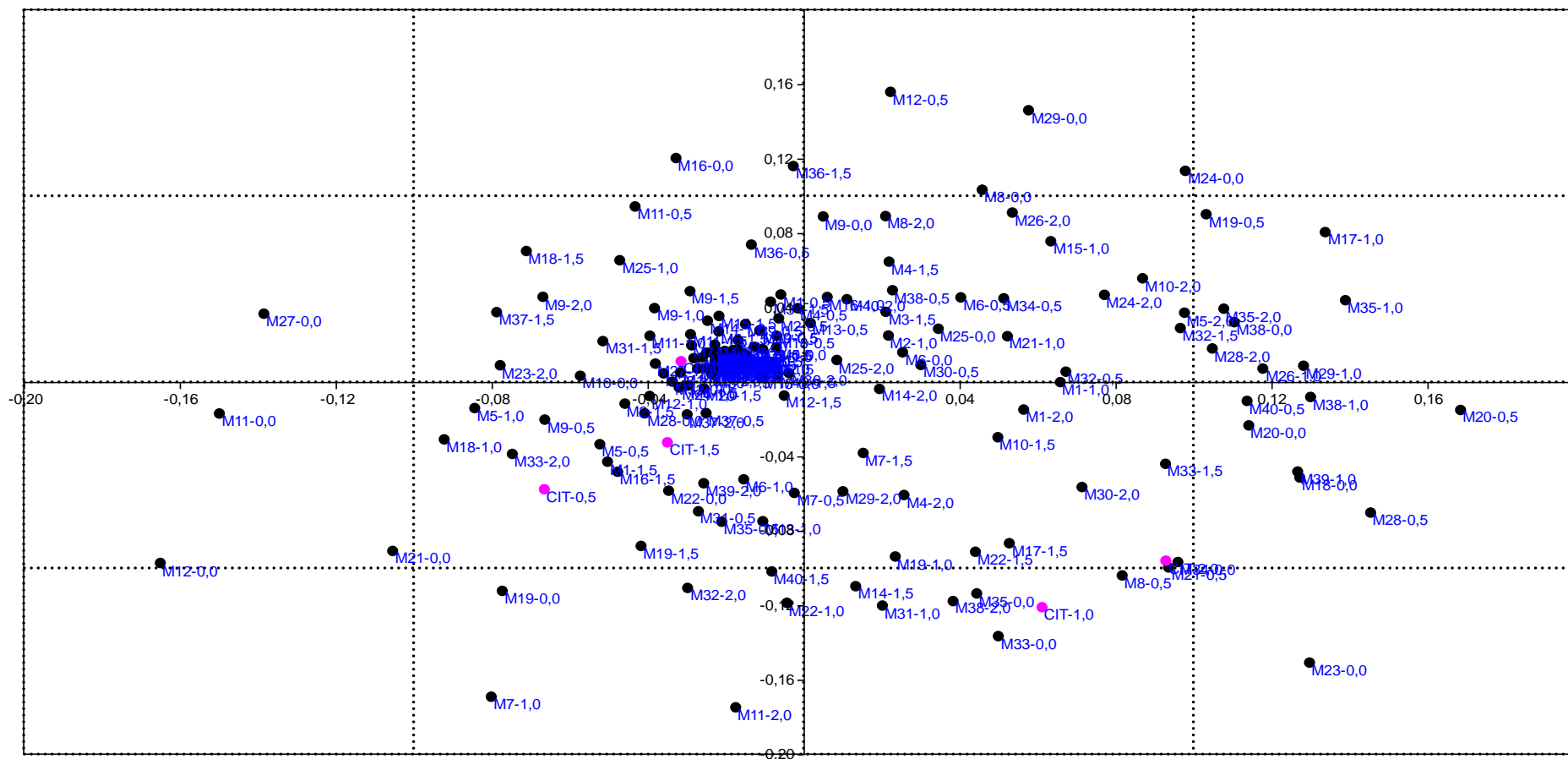
Nota: Gráfica NMDS - 0D sin terpineol, eucaliptol ni α -pineno, con un valor de stress = 0,1634 y RSQ = 0,7914 utilizando distancia Manhattan. Elaborado por: Los Autores, (2017)

Anexo 8. NMDS Parcial - 1D



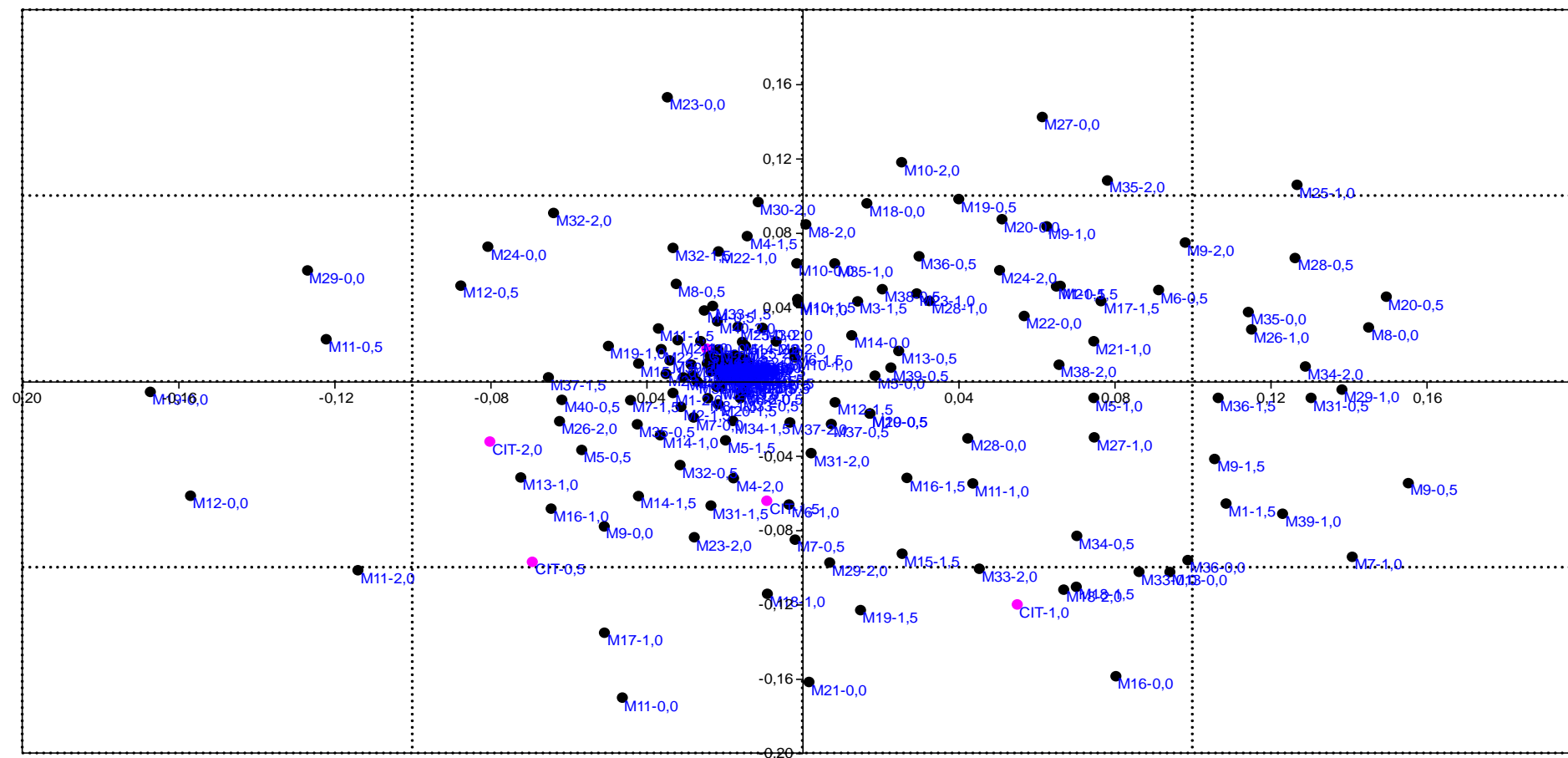
Nota: Gráfica NMDS - 1D sin terpineol, eucaliptol ni α -pineno, con un valor de stress = 0,444 y RSQ = 0,2776 utilizando distancia Manhattan.
Elaborado por: Los Autores, (2017)

Anexo 9. NMDS Parcial - 2D



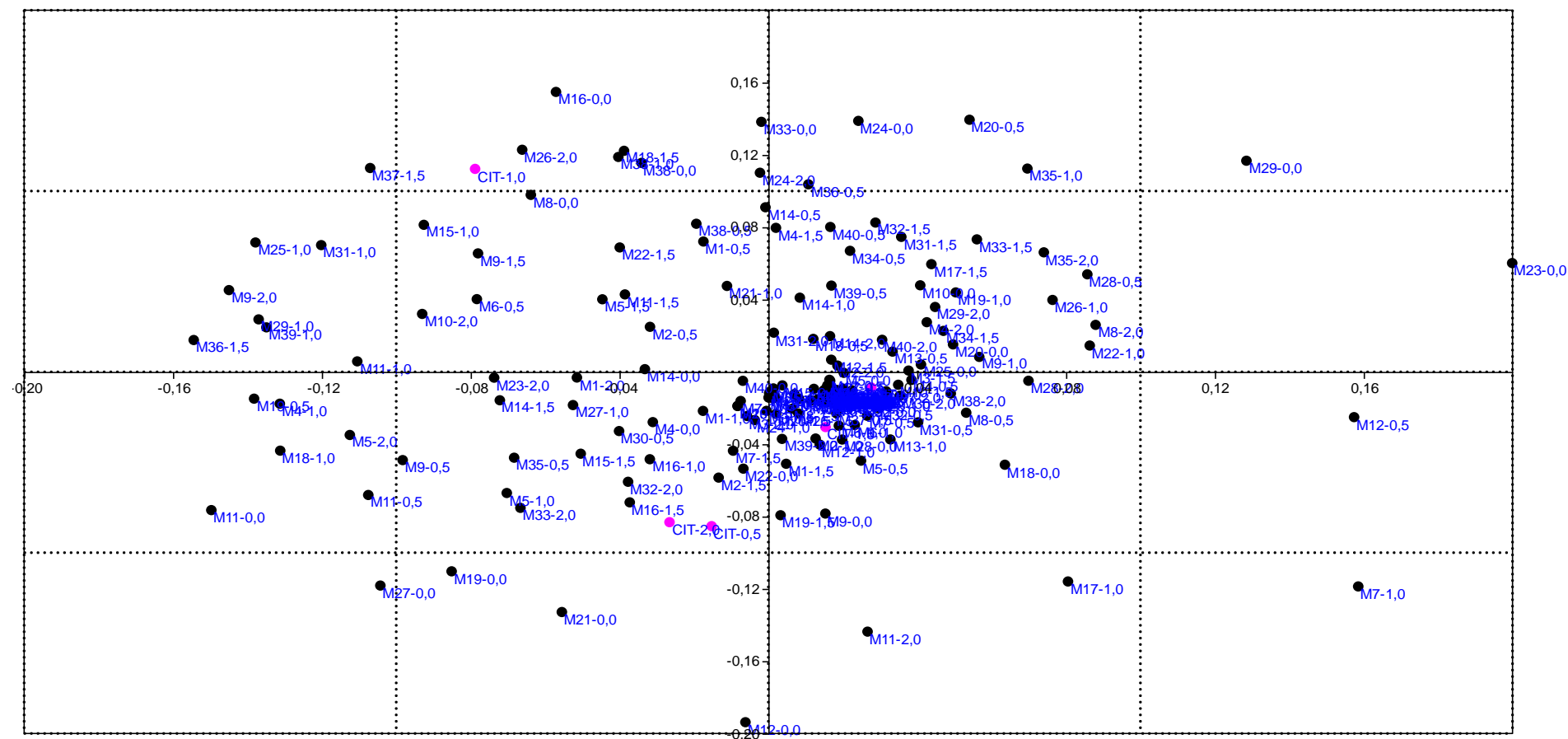
Nota: Gráfica NMDS - 2D sin terpineol, eucaliptol ni α -pineno, con un valor de stress = 0,441 y RSQ = 0,266 utilizando distancia Manhattan.
Elaborado por: Los Autores, (2017)

Anexo 2. NMDS Parcial - 3D



Nota: Gráfica NMDS - 3D sin terpineol, eucaliptol ni α -pineno, con un valor de stress = 0,4247 y RSQ = 0,2639 utilizando distancia Manhattan.
Elaborado por: Los Autores, (2017)

Anexo 31. NMDS Parcial - 4D



Nota: Gráfica NMDS - 4D sin terpineol, eucaliptol ni α -pineno, con un valor de stress = 0,4131 y RSQ = 0,2824 utilizando distancia Manhattan. Elaborado por: Los Autores, (2017)